

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

Přiložená dokumentace

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO. POUZE PRO EXPORT.

Účel použití

Rozbor TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) *in vitro* používá cílené sekvenování nové generace k detekci variant v 517 genech s použitím nukleových kyselin extrahovaných ze vzorků nádorových tkání fixovaných formalínem a zalitých do parafínu (FFPE), které pocházejí od pacientů s karcinomem se solidními maligními neoplazmy, prostřednictvím přístroje Illumina® NextSeq™ 550Dx. Test lze použít pro detekci jednonukleotidových variant, vícenukleotidových variant, inzercí, delecí a genových amplifikací z DNA a genových fúzí a splice variant z RNA. Test také vykazuje skóre nádorové mutační zátěže (TMB) a stav mikrosatelitové nestability (MSI).

Test je určený jako doprovodná diagnostika k identifikaci pacientů s karcinomem pro léčbu cílenou terapií uvedenou v [Tabulka 1](#), v souladu se schváleným terapeutickým označením výrobku. Kromě toho je test určen k poskytnutí informací o profilování nádoru při použití kvalifikovaným zdravotnickým personálem v souladu s odbornými pokyny a není průkazný nebo normativní k označenému použití žádného konkrétního zdravotnického prostředku.

Tabulka 1 Označení doprovodné diagnostiky

Typ nádoru	Biomarkery	Cílená terapie
Solidní nádory	Genové fúze NTRK1, NTRK2 a NTRK3	VITRAKVI® (larotrectinib)

Shrnutí a vysvětlení rozboru

Klinický popis

Rakovina je hlavní světovou příčinou úmrtí a má potenciál vznikat v každé tkáni.^{1, 2} Analýza genetické báze nádoru je důležitá k identifikaci pacientů, kteří mohou mít prospěch z cílených terapií, a pro rozvoj nových léčebných metod. Vznik a progresi nádorů ovlivňuje množství genů a mnoho nádorů má různé varianty, které mají vliv na tyto geny a jejich funkce. Tyto varianty mohou zahrnovat genové mutace, jako jsou jednonukleotidové varianty (SNV), vícenukleotidové varianty (MNV), inzerce nebo delece, genové amplifikace, genové fúze a splice varianty. Dalším důsledkem mutací rakovinových genů je prezentace neoantigenů, které mohou vyvolat imunitní odpověď specifickou pro nádorové onemocnění. Stav mutace nádorového onemocnění může být reprezentován nádorovou mutační zátěží (TMB) a mikrosatelitovou nestabilitou (MSI), což jsou genomové podpisy spojené s genomovou nestabilitou a prezentací rakovinového neoantigenu.

TruSight Oncology Comprehensive je kvalitativní test sekvenování nové generace (NGS) pro komplexní genomové profilování (CGP), který široce vyhodnocuje genomové varianty ve velkém panelu genů souvisejících s karcinomem, které uvádí [Tabulka 2](#). Rozbor detekuje malé varianty v 517 genech plus genové amplifikace, fúze a splice varianty viz [Tabulka 2](#). Rozbor poskytuje pokrytí kódovací sekvence pro všechny geny s výjimkou genu TERT, kde je pokryta pouze oblast promotoru, a hodnotí skóre TMB a stav MSI. Tyto cíle analýzy zahrnují obsah citovaný odbornými organizacemi a dalšími hlavními směrnici USA. Návrh rozboru TSO Comprehensive ovlivnily také publikace nezávislého konsorcia a farmaceutický výzkum v pozdní fázi.

Seznam oblastí vyloučených z přiřazení variant je uveden v blokačním seznamu *TruSight Oncology Comprehensive Block List* (dokument č. 200009524) na [webu podpory](#) Illumina.

V [Tabulka 2](#) jsou uvedeny následující kategorie typů variant: Malá varianta DNA (S), genová amplifikace (A), fúze (F) a splice varianta (Sp). Mezi malé varianty DNA patří SNV, MNV a inzerce a delece.

Tabulka 2 TSO Comprehensive (EU) Panel genu rozboru

Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty	Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty	Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S

Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty	Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty	Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S

Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty	Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty	Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHBA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S

Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty	Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty	Č.	Entrez ID	Gen	Typ varianty
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S

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

Principy postupu

Rozbor TSO Comprehensive (EU) je distribuovaný test, který se provádí manuálně za použití extrahované nukleové kyseliny jako vstupního materiálu. DNA nebo RNA extrahovaná z formalínem fixované a do parafínu vložené tkáně (FFPE) se používá k přípravě knihoven, které jsou potom obohaceny o geny související s karcinomem a sekvenovány pomocí Přístroj NextSeq 550Dx.

Rozbor TSO Comprehensive (EU) zahrnuje následující procesy.

- **Příprava a obohacení knihovny** – Pro RNA se 40 ng celkového množství převede na dvouvláknovou komplementární DNA (cDNA). Pro genomovou DNA (gDNA) se 40 ng gDNA rozstříhá na malé fragmenty. Univerzální adaptéry pro sekvenování jsou ligovány na fragment cDNA a gDNA. V každé knihovně jsou zahrnuty sekvence adaptérů P5 a P7, aby během sekvenování došlo k zachycení fragmentů knihovny na povrchu průtokové kyvety. Adaptéry zahrnují indexové sekvence i5 a i7 k identifikaci jednotlivých vzorků a u knihoven ze vzorků gDNA jednotlivých molekul s použitím jedinečných molekulárních identifikátorů (UMI). Knihovny se poté obohatí o konkrétní sledované geny pomocí metody založené na zachycení. Biotinované sondovací sekvence, které zahrnují genomické oblasti zájmu zaměřené pomocí rozboru, se hybridizují do knihoven. Sondy a hybridizované cílené knihovny se izolují od necílených knihoven tím způsobem, že se zachytí streptavidinovými magnetickými částicemi. Cílené obohacené knihovny se vymyjí a amplifikují. Množství každé obohacené knihovny je následně normalizováno metodou založenou na částicích, aby se zajistila rovnocenná reprezentace knihoven ve fondu pro sekvenování.
- **Sekvenování a primární analýza** – Normalizované obohacené knihovny se dostanou ve fondu a klastru do průtokové kyvety a poté se sekvenují pomocí chemikálií pro technologii SBS za použití NextSeq 550Dx. Technologie SBS využívá metodu jednoduchého reverzibilního terminátoru k detekci fluorescenčně značených deoxynukleotid trifosfátových (dNTP) bází tak, jak se začleňují do rostoucích řetězců DNA. Během každého cyklu sekvenování se do řetězce nukleové kyseliny přidává jeden dNTP. Označení dNTP slouží jako terminátor polymerizace. Po každé inkorporaci dNTP identifikuje fluorescenční barvivo základnu a následně se oddělí, aby umožnilo inkorporaci dalšího nukleotidu. Čtyři dNTP vázané na reverzibilní terminátor (A, G, T a C) jsou přítomny jako samostatné oddělené molekuly. Díky tomu se v důsledku přirozené soutěže minimalizuje zkreslení inkorporace. Během primární analýzy se v průběhu jednotlivých sekvenačních cyklů provádí přiřazení báze přímo z měření intenzity signálu, což vede k -postupnému- sekvenování bází. Ke každému přiřazení báze se přiřazuje skóre kvality.
- **Sekundární analýza** – Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) se nachází v přístroji NextSeq 550Dx jako součást softwaru Local Run Manager, kde zajišťuje nastavení běhu TSO Comprehensive (EU) a provádí sekundární analýzu z výsledků sekvenování. Sekundární analýza zahrnuje validaci zpracování běhu a kontrolu kvality, po kterých následuje demultiplexování, generování souborů FASTQ, zarovnávání a přiřazování variant. Demultiplexování odděluje data z fondů knihoven na základě indexů s jedinečnou sekvencí, které byly přidány během postupu přípravy knihovny. Generují se přechodné soubory FASTQ, které obsahují sekvenační čtení pro každý vzorek a skóre kvality, s výjimkou čtení z jakýchkoli klastrů, které neprošly filtrem. Čtení sekvenování se poté zarovnají podle referenčního genomu za účelem identifikace závislosti mezi sekvencemi a přiřazeným skóre na základě podobných oblastí. Zarovnaná čtení se zapíší do souborů ve formátu BAM. Software pro rozbor používá nezávislé

algoritmy pro knihovny generované ze vzorků DNA nebo RNA pro přiřazení malých variant DNA, genových amplifikací, TMB a MSI pro vzorky DNA a fúze a splice varianty pro vzorky RNA. Analytický softwarový modul vygeneruje několik výstupů včetně metrik sekvenování a souborů ve formátu přiřazení variant (VCF). Soubory VCF obsahují informace o variantách nalezených na určitých pozicích v referenčním genomu. Pro každý vzorek se generují sekvenční metriky a samostatné výstupní soubory. Podrobnosti o sekundární a terciární analýze naleznete v části *Průvodce pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661).

- **Terciární analýza** – Terciární analýza, kterou provádí Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU), se skládá z výpočtů TMB a MSI, přiřazení doprovodné diagnostiky, profilování nádorů u variant ve dvou úrovních klinické významnosti na základě znalostní báze (KB) a typu tkáně a generování výkazů výsledků. Profilování nádorů se také někdy označuje jako komplexní genomové profilování. Interpretace výsledků variant a výsledky biomarkerů TMB a MSI jsou shrnuty ve výkazu výsledků TSO Comprehensive (EU).

Omezení postupu

Určeno pouze k diagnostice *in vitro*.

- Použití pouze na lékařský předpis. Test musí být používán v souladu s předpisy platnými pro klinické laboratoře.
- Genomová zjištění, jež uvádí [Tabulka 2](#) zamýšleného použití, nejsou průkazná nebo normativní k označenému použití žádného konkrétního zdravotnického prostředku.
- U variant uvedených ve výkazu výsledků TSO Comprehensive (EU) v části Genomové nálezy s důkazy o klinické významnosti (úroveň 2) a genomové nálezy s potenciální klinickou významností (úroveň 3) nebylo provedeno klinické hodnocení.
- Rozhodnutí o péči a léčbě pacienta musí být založeno na nezávislém odborném posouzení ošetřujícího lékaře, které bere v úvahu všechny příslušné informace týkající se pacientova stavu, například jeho vlastní i rodinnou anamnézu, lékařská vyšetření, informace z ostatních diagnostických testů a pacientovy volby, v souladu se standardy péče v dané komunitě.
- Kvalita vzorků FFPE je velmi proměnlivá. Vzorky, které neprošly standardním postupem fixace, nemusí vygenerovat extrahované nukleové kyseliny splňující požadavky kontroly kvality rozboru ([Kontrola kvality na straně 79](#)). Bloky FFPE skladované déle než pět let vykazaly nižší platnost.
- Účinnost TSO Comprehensive (EU) u vzorků získaných od pacientů s transplantací orgánu či tkáně nebyly hodnoceny.
- Velké podíly nekrotické tkáně ($\geq 23\%$) mohou mít vliv na schopnost rozboru TSO Comprehensive (EU) detekovat genové amplifikace a fúze RNA.
- Detekce somatických řídicích mutací může být nespolehlivá, pokud je obsah nádoru (na základě plochy) menší než 20 %.
- Výsledek mikrosatelitově stabilních (MS-Stable) může být nespolehlivý, pokud je obsah nádoru nižší než 30 %. Výsledek mikrosatelitově vysokých (MSI-High) je správný bez ohledu na obsah nádoru.

- Hemoglobin v tkáni snižuje počet podpůrných čtení pro splice varianty MET.
- U vysoce přestavěných genomů s delecemi a ztrátou heterozygosity může software TSO Comprehensive (EU) chybně klasifikovat vzorek DNA jako kontaminovaný (CONTAMINATION_SCORE > 3106 a p-hodnota > 0,049).
- Negativní výsledek nevylučuje přítomnost mutace pod mezí detekce (LoD) rozboru.
- Na citlivost detekce malých variant DNA může mít vliv:
 - Genomový kontext s malou složitostí.
 - Zvětšující se délka variant.
- Skóre TMB mohou být nepřesná v následujících kontextech:
 - Když nádor dosáhne úrovně, kde konvergují frekvence germinální a somatické variantní alely (VAF).
 - U populací nedostatečně zastoupených ve veřejných databázích.
- Amplifikace genů jsou jediné varianty počtu kopií hlášené TSO Comprehensive (EU). Delece genů se v rozboru neuvádějí.
- Algoritmy pro přiřazení fúze v softwaru rozboru TSO Comprehensive (EU) nemusí brát v úvahu důkazy ze čtení, která přesahují hranice anotovaných genů.
- Na citlivost detekce fúzí může mít vliv:
 - Nízká složitost knihovny mající za následek snížení podpůrných čtení vzhledem k odchylkám v pracovním postupu rozboru (viz například postup [Denaturace a žihání RNA na straně 43](#)).
 - Když jednotlivý gen zasahuje do obou bodů zlomu.
 - Případy, kdy je několik bodů zlomu fúzí navzájem v těsné blízkosti s jedním nebo více partnery; několik bodů zlomu a partnerů pak může být vykázáno jako jeden bod zlomu a partner.
 - Když je medián vložené velikosti příliš malý. Vyžaduje se minimální medián vložené velikosti 80 bp, ale v rozsahu 80–100 bp citlivost klesá.
 - Malá složitost sekvence nebo souhlasný genomový kontext kolem bodů zlomu fúze.
- Na rozlišení genů zahrnutých ve fúzi může mít vliv, když se body zlomu fúze ocitnou v genomových oblastech obsahujících překrývající se geny. Pokud více genů překrývá bod zlomu, rozbor vykáže všechny geny, oddělené středníky.
- Nekonzistentní pokrytí v oblasti TERT Promoter může mít za následek nepřítomnost výsledku vzhledem k malé hloubce.
- Chyby poznámek nebo KB mohou způsobit falešně pozitivní nebo falešně negativní výsledek, včetně výpisu varianty na chybné úrovni (mezi genomovými nálezy s důkazy o klinické významnosti (úroveň 2) a genomovými nálezy s potenciální klinickou významností (úroveň 3)), nebo by informace poznámky ve výkazu mohla být nesprávná. Na varianty uvedené ve výsledcích CDx nemají chyby poznámek nebo KB vliv. Chyba může pocházet z těchto tří zdrojů:
 - TSO Comprehensive (EU) poznámka k variantě. Chybovost je přibližně 0,0027 %, na základě analýzy 2 448 350 variant z COSMIC v92, takže existuje malá pravděpodobnost chyby.
 - Chyba KB vzniklá během sestavení.

- Relevantnost KB se v průběhu času mění. Výkaz odráží znalosti v době, kdy byla znalostní báze sestavena.
- TSO Comprehensive (EU) je určen k vykazování somatických variant při vykazování variant s prokázanou klinickou významností nebo variant s potenciální klinickou významností. Jelikož se jedná o test pouze na nádory, je hlášení germinálních (dědičných) variant možné, ale neúmyslné. TSO Comprehensive (EU) používá KB k hlášení variant bez explicitní poznámky, zda jsou germinálního nebo somatického původu.
- Znalostní báze zahrnuje pouze terapeutické, diagnostické a prognostické asociace, které jsou relevantní pro varianty přítomné v rámci prokázaného solidního zhoubného nádoru. Náchylnost nebo rizikové faktory nádorů nejsou ve znalostní bázi zahrnuty.
- Následující tabulka uvádí změny nukleotidů u tří variant RET, které rozbor nedokáže detekovat. Pro stejnou změnu aminokyseliny lze detekovat další změny nukleotidů.

Tabulka 3 Změny nukleotidů u tří variant RET

Změna aminokyseliny	Chr*	Pozice	Referenční alela	Alternativní
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGG

* Chr = Chromozom

Složky produktu

Rozbor TSO Comprehensive (EU) se skládá z následujících složek:

- Sada TruSight Oncology Comprehensive (EU) (katalogové č. Illumina 20063092) – sada obsahuje reagenty s dostatečným objemem pro generování 24 knihoven DNA a 24 knihoven RNA. Tento objem zahrnuje vzorky pacientů a kontroly. Kontroly se prodávají samostatně (viz [Požadované reagenty, nedodané na straně 16](#)).
- Znalostní báze: Pravidelně se aktualizuje a je k dispozici ke stažení na portálu Lighthouse Illumina.
- Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (katalogové č. Illumina 20051843), který obsahuje následující součásti:
 - Sady tvrzení TSO Comprehensive

- Softwarová sada TSO Comprehensive
- Sada USB TSO Comprehensive

Servisní pracovník Illumina nainstaluje příslušnou verzi Analytický modul TSO Comprehensive (EU) na Local Run Manager Přístroj NextSeq 550Dx. Podrobné informace o modulu analýzy viz Průvodce pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661).

Reagencie

Dodané reagencie

Se sadou rozboru TSO Comprehensive (EU) se dodávají následující reagencie.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Reagencie	Číslo součásti	Množství	Objem	Účinné látky	Skladovací teplota
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli, DNA polymerase, RNázu H a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli a náhodné hexamery	-25 °C až -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující reverse transcriptase	-25 °C až -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (mrazení), PN 20031118

Reagencie	Číslo součásti	Množství	Objem	Účinné látky	Skladovací teplota
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující T4 DNA polymerázu a polynukleotidovou kinázu	-25 °C až -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli	-25 °C až -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující ligázu	-25 °C až -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující univerzální sekvenační oligonukleotidy	-25 °C až -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující univerzální sekvenační oligonukleotidy	-25 °C až -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli	-25 °C až -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující DNA polymerázu a nukleotidy	-25 °C až -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (chlazení), PN 20031119

Reagencie	Číslo součásti	Množství	Objem	Účinné látky	Skladovací teplota
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli	2 °C až 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodný roztok obsahující magnetické částice	2 °C až 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Roztok Tris EDTA	2 °C až 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

Účinné látky: Pufrovaný vodný roztok obsahující oligonukleotidové primery, které jsou jednotlivě označené čárovým kódem.



UPOZORNĚNÍ

Pro vzorky RNA nebo DNA používejte indexační primery (UPxx). Nekombinujte indexační primery CPxx a UPxx v jedné knihovně.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Účinné látky: Pufrovaný vodný roztok obsahující oligonukleotidové primery, které jsou jednotlivě označené čárovým kódem.

**UPOZORNĚNÍ**

Kombinační indexační primery (CPxx) použijte pouze pro vzorky DNA. Nekombinujte indexační primery CPxx a UPxx v jedné knihovně.

Indexační primer	Číslo součásti	Množství	Objem	Index i7	Sekvence	Index i5	Sekvence	Skladovací teplota
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (chlazení), PN 20031123

Reagencie	Číslo součásti	Množství	Objem	Účinné látky	Skladovací teplota
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující formamid a soli	2 °C až 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli a pevné paramagnetické částice kovalentně potažené streptavidinem	2 °C až 8 °C

Reagencie	Číslo součásti	Množství	Objem	Účinné látky	Skladovací teplota
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Roztok hydroxidu sodného	2 °C až 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Pufrovaný vodný roztok	2 °C až 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující pevné paramagnetické částice	2 °C až 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli, 2-merkptoethanol a formamid	2 °C až 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli	2 °C až 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli	2 °C až 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodný roztok obsahující magnetické částice	2 °C až 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (mrazení), PN 20031121

Reagencie	Číslo součásti	Množství	Objem	Účinné látky	Skladovací teplota
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující oligonukleotidy	-25 °C až -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli	-25 °C až -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující čisticí prostředek	-25 °C až -15 °C

Reagencie	Číslo součásti	Množství	Objem	Účinné látky	Skladovací teplota
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující DNA polymerázu a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující primery P5 a P7	-25 °C až -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli, 2-merkapt ethanol a formamid	-25 °C až -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 nebo PhiX)	20031492	1	10 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující genomickou DNA PhiX	-25 °C až -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reagencie	Číslo součásti	Množství	Objem	Účinné látky	Skladovací teplota
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Fond obsahující oligonukleotidové sondy	-25 °C až -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Fond obsahující oligonukleotidové sondy	-25 °C až -15 °C

Požadované reagencie, nedodané

Reagencie před amplifikací

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents – Požadavky na reagencie naleznete v části [Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27](#).
- DNA and RNA Quantification Reagents – Požadavky na reagencie naleznete v části [Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27](#).
- Kontroly TruSight Oncology:
 - Kontrola DNA TruSight Oncology (katalogové č. Illumina 20065041)
 - Kontrola RNA TruSight Oncology (katalogové č. Illumina 20065042)

- 100 % ethanol (EtOH) (200 proof), v kvalitě pro molekulární biologii
- Voda prostáRNáz/DNáz

Reagencie po amplifikaci

- Sada reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) (Illumina katalogové č. 20028871)
 - Zásobník s průtokovou kyvetou NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklů)
 - Zásobník s reagensiemi NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů)
 - Zásobník s pufrem NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklů)
- 100 % EtOH (200 proof), v kvalitě pro molekulární biologii
- Voda prostáRNáz/DNáz

Skladování reagensií a nakládání s nimi

Následující krabice reagensií se dodávají zmrazené. Skladujte při teplotě –25 °C až –15 °C.

Krabice	Číslo součásti	Laboratorní oblast
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Před amplifikací
TruSight Oncology Comp Library Prep (mrazení)	20031118	Před amplifikací
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Před amplifikací
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Před amplifikací
TruSight Oncology Comp Enrichment (mrazení)	20031121	Po amplifikaci
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Po amplifikaci



UPOZORNĚNÍ

Neskladujte reagenty v nezmrazeném prostoru ani ve dveřních přihrádkách v chladničce.

Následující krabice reagensů se dodávají na gelových baleních, aby se zajistila stálá teplota 0 °C až 10 °C. Skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C.

Krabice	Číslo součásti	Laboratorní oblast
TruSight Oncology Comp Library Prep (chlazení)	20031119	Před amplifikací
TruSight Oncology Comp Enrichment (chlazení)	20031123	Po amplifikaci



UPOZORNĚNÍ

Nezmrazujte reagenty, které obsahují částice (LNB1, SPB a SMB).

- Změny fyzického vzhledu reagensů mohou znamenat poškození materiálů. Dojde-li ke změně fyzického vzhledu (například ke změnám barvy reagensů nebo zákalu), reagenty nepoužívejte.
- FSM, SSM, ERA1-B a TCB1 mohou obsahovat částice související s produktem. Dodržujte specifické pokyny pro manipulaci s jednotlivými reagenty. Po provedení kroků míchání FSM a SSM nemají zbývající bílé částice související s produktem vliv na výkon.
- Byla vyhodnocena stabilita rozboru TSO Comprehensive (EU) a byla prokázána účinnost až pro čtyři použití sady. Reagenty jsou stabilní, pokud jsou uskladněny při uvedených teplotách skladování, do data expirace uvedeného na štítku krabice.

Vybavení a materiály

Potřebné vybavení a materiály, které nejsou součástí dodávky

Vybavení a materiály před amplifikací

Vybavení	Dodavatel
Ultrasonikátor s přidruženým příslušenstvím Viz Nastavení konfigurace ultrasonikátoru pro fragmentaci DNA na straně 22 .	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

Vybavení	Dodavatel
Termocyklér s následujícími specifikacemi: • Vyhřívané víko s možností nastavení na 30 °C a 100 °C (nebo vypnutí, pokud nastavení na 30 °C není možné) • Teplotní rozsah 4 °C – 99 °C • Přesnost teploty ± 0,25 °C • Kompatibilní s deskami PCR s 96 jamkami, 0,2 ml • Viz Rychlost stoupání teploty termocykléru na straně 25	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Vortexová třepačka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Inkubátory mikrovzorků (2) s vložkami pro desky MIDI s 96 jamkami (2)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Mikroodstředivka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Centrifuga destiček s následujícími specifikacemi: • Kompatibilní s mikrodestičkami MIDI s 96 jamkami • Dosahuje 280 g (+/- 10 %)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Třepačka destiček s následujícími specifikacemi: • Orbit 2 mm • Možnost protřepávání rychlostí 1 200 a 1 800 ot./min	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Těsnicí klín nebo válec	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Magnetický stojan s následujícími specifikacemi: • Určeno pro srážení/separaci paramagnetických částic • Magnety po stranách stojanu (ne dole) • Kompatibilní s destičkami MIDI s 96 jamkami	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Přesné pipety schopné přesně dávkovat objemy od 2 µl do 1000 µl s následujícími specifikacemi: • Jednokanálová nebo vícekanálová pipeta se zvyšováním po 0,02 µl • Jednokanálová nebo vícekanálová pipeta se zvyšováním po 0,1 µl, 0,2 µl nebo 0,5 µl • Jednokanálová nebo vícekanálová pipeta se zvyšováním po 1 µl nebo 2 µl Pipety musí být pravidelně kalibrovány s přesností na 5 % uvedeného objemu.	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Pipetovací pomůcka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

Vybavení	Dodavatel
Led nebo chladicí vložka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Sérologické pipety 10 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Lepicí těsnění na desky s 96 jamkami s následujícími specifikacemi: • Sloupnutelné • Vhodné desky PCR s lemem nebo polovičním lemem • Silné lepidlo, které odolává opakovaným změnám teploty v rozsahu -20°C do 100°C • Bez DNáz/RNáz	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Zkumavky mikroodstředivky o objemu 1,7 ml, bez nukleázy	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Zásobník reagentů bez nukleázy (jednorázové žlaby, 50 ml) (nebo ekvivalentní)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Kónické zkumavky 15 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Kónické zkumavky 50 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Kompatibilní hroty pro pipety odolné proti aerosolu	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Úložné desky s 96 jamkami, 0,8 ml (desky MIDI)	Fisher Scientific, č. součásti AB-0859 nebo ekvivalent
Desky PCR s 96 jamkami kompatibilní s termocyklerem, 0,2 ml (polypropylenové jamky)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

Vybavení a materiály po amplifikaci

Vybavení	Dodavatel
Přístroj NextSeq 550Dx	Illumina, katalogové č. 20005715
Centrifuga destiček s následujícími specifikacemi: • Kompatibilní s mikrodestičkami MIDI s 96 jamkami • Dosahuje 280 g (+/- 10 %)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

Vybavení	Dodavatel
Termocyklér s následujícími specifikacemi: • Vyhřívání víko (100 °C) • Teplotní rozsah 4 °C – 99 °C • Přesnost teploty $\pm 0,25$ °C • Kompatibilní s deskami PCR s 96 jamkami, 0,2 ml • Viz Rychlost stoupání teploty termocykléru na straně 25	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Vortexová třepačka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Inkubátor mikrovzorků s vložkou pro desky MIDI s 96 jamkami	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Suchý tepelný blok s následujícími specifikacemi: • Teplotní rozsah 25 °C – 99 °C • Přesnost teploty ± 5 °C • Ujistěte se, že zkumavky mikroodstředivky jsou kompatibilní s tepelným blokem	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Třepačka destiček s následujícími specifikacemi: • Orbit 2 mm • Možnost protřepávání rychlostí 1 200 a 1 800 ot./min	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Mikroodstředivka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Těsnicí klín nebo válec	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Magnetický stojan s následujícími specifikacemi: • Určeno pro srážení/separaci paramagnetických částic • Magnety po stranách stojanu (ne dole) • Kompatibilní s destičkami MIDI s 96 jamkami	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Přesné pipety schopné přesně dávkovat objemy od 2 µl do 1000 µl s následujícími specifikacemi: • Jednokanálová nebo vícekanálová pipeta se zvyšováním po 0,02 µl • Jednokanálová nebo vícekanálová pipeta se zvyšováním po 0,1 µl, 0,2 µl nebo 0,5 µl • Jednokanálová nebo vícekanálová pipeta se zvyšováním po 1 µl nebo 2 µl Pipety musí být pravidelně kalibrovány s přesností na 5 % uvedeného objemu.	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Pipetovací pomůcka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

Vybavení	Dodavatel
Sérologické pipety 10 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Lepicí těsnění na desky s 96 jamkami s následujícími specifikacemi: • Sloupnutelné • Vhodné desky PCR s lemem nebo polovičním lemem • Silné lepidlo, které odolává opakovaným změnám teploty v rozsahu -20°C do 100°C • Bez DNáz/RNáz	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Zkumavky mikroadstředivky o objemu 2 ml, bez nukleázy	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Zkumavky mikroadstředivky o objemu 1,7 ml, bez nukleázy	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Zásobník reagentů bez nukleázy (jednorázové žlaby, 50 ml) (nebo ekvivalentní)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Kónické zkumavky 15 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Kónické zkumavky 50 ml	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Kompatibilní hroty pro pipety odolné proti aerosolu	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Úložné desky s 96 jamkami, 0,8 ml (desky MIDI)	Fisher Scientific, č. součásti AB-0859 nebo ekvivalent
Desky PCR s 96 jamkami kompatibilní s termocyklerem, 0,2 ml (polypropylenové jamky)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Led nebo chladicí vložka	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

Nastavení konfigurace ultrasonikátoru pro fragmentaci DNA

Fragmentace nebo stříhání DNA má vliv na účinnost rozboru, protože určuje rozložení velikostí fragmentů, které zase ovlivňují pokrytí sekvenování. Pro rozbor TSO Comprehensive (EU) bylo vyhodnoceno a optimalizováno několik konfigurací fokusované ultrasonikace ([Tabulka 4](#)).

- Čas stříhání byl upraven tak, aby byla maximalizována metrika MEDIAN_EXON_COVERAGE popsaná v části [Kontrola kvality na straně 79](#). Časy stříhání (viz [Tabulka 4](#)) a výsledky metriky MEDIAN_INSERT_SIZE se v jednotlivých konfiguracích lišily.
- Konfigurace 1–4 a 6 byly testovány s 8proužkovými skleněnými zkumavkami. Konfigurace 5 používala jednu skleněnou zkumavku. Objemové kapacity zkumavek uvádí [Tabulka 4](#).

- Optimalizace konfigurací 3–6 (menší objemy vodní lázně) používala pulzaci.
- Konfigurace 3–5 byly stříhány ve zkumavkách s menším objemem. Objemové kapacity zkumavek ovlivňují parametry stříhání.
- Konfigurace 4 (lineární snímač, střední objem vodní lázně, odplyněná voda) vyžadovala dlouhou dobu zpoždění impulsu (40 sekund), aby bylo dosaženo podobného MEDIAN_EXON_COVERAGE jako u konfigurací 1 a 2 při nominálním vstupu 40 ng.
- Optimální nastavení konfigurace 3 mělo za následek mírně větší rozložení velikosti fragmentu ve srovnání s ostatními konfiguracemi (MEDIAN_INSERT_SIZE bylo přibližně o 5–10 párů bází větší).
- Konfigurace 3 a 5 používaly neodplyněnou vodu a nejmenší objem vodní lázně.
- Konfigurace 3 a 5 potřebovaly zvýšený vstup DNA (50 ng pro konfiguraci 3, 60 ng pro konfiguraci 5), aby bylo dosaženo podobného MEDIAN_EXON_COVERAGE ve srovnání s ostatními 4 konfiguracemi, které používaly nominální vstup 40 ng.
- U konfigurace 3 a 5 jsou větší ztráty resp. denaturace a tudíž má i menší efektivní množství molekul dsDNA použitelných pro přípravu knihovny.

Stříhací zkumavky při procesu regenerace odstředíte, aby bylo zajištěno získání konkrétního objemu, protože ztráta materiálu může negativně ovlivnit účinnost.

Tabulka 4 Hodnocení konfigurací fokusovaného ultrasonikátoru

Parametr	Konfigurace					
	1	2	3	4	5	6
Snímač	Čára	Bod	Bod	Čára	Bod	Čára
Objem vodní lázně	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Voda odplyněná	Ano	Ano	Ne	Ano	Ne	Ano
Chladič vody	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano	Ano
Teplota vodní lázně	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20° C	10° C
Peak Incident Power (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
Činitel využití (%)	30	10	30	25	20	25
Cyklů na burst	200	200	1000	1000	1000	600
Pulzace (10sekundové bursty)	Ne	Ne	Ano	Ano	Ano	Ano
Doba zpoždění pulzace	Není k dispozici	Není k dispozici	10 s	40 s	10 s	10 s
Čas střihání	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Zpracování vzorků	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Velikost dávky	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Skleněná 8-Strip zkumavka velikosti vzorku	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Jedna zkumavka (50 µl)	130 µl (nebo destička 96 microTUBE)
Dithering	Není k dispozici	Není k dispozici	Není k dispozici	3 mm Y při 20 mm/s	Není k dispozici	1,5 mm Y při 10 mm/s
Ekvivalent vstupu DNA (pro medián pokrytí exonu)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Čas střihání 200 sekund je tvořen 20krát opakovanými 10sekundovými bursty.² Čas střihání 320 sekund je tvořen 32krát opakovanými 10sekundovými bursty.

Rychlost stoupání teploty termocykléru

Rychlost stoupání teploty termocykléru má vliv na metriky kontroly kvality rozboru (použitelná místa MSI, mediánový cíl počtu souborů bin CNV, medián vložené velikosti (RNA)), stejně jako podpurná čtení u splice variant a fúzí. Doporučuje se optimalizovat rychlost stoupání teploty termocykléru. Například testovaný model byl upraven z výchozí (a maximální) rychlosti náběhu 5°C/s na 3°C/s, aby se dosáhlo srovnatelných výsledků s jinými modely s nižšími výchozími rychlostmi náběhu.

Odběr, přeprava a skladování vzorků

Při odběru, přepravě, skladování a zpracování vzorků dodržujte standardní postupy.

Požadavky vzorků

Tkáň FFPE

Rozbor TSO Comprehensive (EU) vyžaduje 40 ng RNA nebo 40 ng DNA extrahované ze tkáně FFPE. Použití RNA i DNA umožňuje analýzu všech deklarovaných typů variant. Tkáň by měla být zafixována za použití formalinu vhodného pro molekulární analýzy (například 10 % neutrálního formalinu). Tkáň nesmí být odvápněna. Před provedením rozboru TSO Comprehensive (EU) by měl být vzorek tkáně vyšetřen patologem, aby se zajistilo, že je pro tento test vhodný. K detekci somatických řídicích mutací je potřeba minimálně 20 % obsah nádoru (podle oblasti). Spolehlivá detekce stavu MSI u různých vzorků vyžaduje minimálně 30% obsah nádoru. Pokud se testuje vzorek s obsahem nádoru nižším než 30 %, aby se určily výsledky s jinými typy variant, mohl by být výsledek MS-Stable nespolehlivý. Výsledek MSI-High je správný bez ohledu na obsah nádoru.

Obsah nádoru u genových amplifikací a variant RNA závisí na rozsahu amplifikace nebo exprese (viz [Obsah nádoru na straně 101](#)).

Pro vysokou pravděpodobnost extrakce 40 ng RNA a 40 ng DNA z různých typů pevných tkání je doporučený objem tkáně $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Tento objem odpovídá kumulativní ploše životaschopné tkáně $\geq 200 \text{ mm}^2$ při použití řezů o tloušťce $5 \mu\text{m}$ nebo $\geq 100 \text{ mm}^2$ při použití řezů o tloušťce $10 \mu\text{m}$. Kumulativní oblast tkáně představuje součet použitelné plochy tkáně na všech řezech odeslaných k extrakci. Kumulativní oblast tkáně 200 mm^2 by mohla například dosažena extrakcí čtyř $5 \mu\text{m}$ řezů s plochou tkáně o 50 mm^2 nebo pěti $10 \mu\text{m}$ řezů s plochou tkáně o 20 mm^2 . Množství výtěžku nukleové kyseliny by mohlo být sníženo nekrózou tkáně. Aby se minimalizovala možnost falešně negativních výsledků, může být tkáň pro dosažení požadovaného použitelného obsahu nádoru makroskopicky rozčleněna.

Velké podíly nekrotické tkáně ($\geq 23 \%$ oblasti) mohou mít vliv na schopnost rozboru TSO Comprehensive (EU) detekovat genové amplifikace a fúze RNA. Pokud části vzorků obsahují více než 23 % nekrotické tkáně v celkové oblasti tkáně, musí se nekrotická tkáň makroskopicky rozčlenit. Pokud laboratoř provádí analýzu RNA, je třeba se při získávání řezů z bloku tkáně vyhnout tkáním s hemoglobinem nebo minimalizovat množství hemoglobinu v tkáni. Viz [Interferující látky na straně 92](#).

Tkáň FFPE na sklíčku lze při pokojové teplotě uchovávat až 28 dní.

Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování

- Extrahujte RNA a DNA ze tkáňových vzorků FFPE pomocí komerčně dostupných sad pro extrakci. Rozdíly v sadách pro extrakci mohou mít vliv na účinnost. Viz [Hodnocení sad pro extrakci nukleové kyseliny na straně 90](#).
- Během extrakce nezvyšujte koncentraci proteinázy K nebo ekvivalentního enzymu oproti standardní koncentraci dodané v sadě pro extrakci. Viz [Interferující látky na straně 92](#).
- Extrahovanou nukleovou kyselinu skladujte podle pokynů od výrobce sady pro extrakci.
- Extrahovanou DNA skladujte až 28 dní při teplotě -25 °C až -15 °C.
- Extrahovanou RNA skladujte až 28 dní při teplotě -85 °C až -65 °C.
- Aby v průběhu času nedocházelo ke změnám v koncentraci, měřte DNA a RNA do 28 dnů od zahájení přípravy knihovny. Kvantifikaci RNA a DNA proveďte metodou fluorometrické kvantifikace, která používá barviva vážící se na nukleové kyseliny. Koncentraci nukleové kyseliny je třeba stanovit jako průměr alespoň tří měření.
- Rozbor vyžaduje přípravu 40 ng každého vzorku RNA ve vodě prosté-RNáz/DNáz (není součástí dodávky) s konečným objemem 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Rozbor vyžaduje 40 ng každého vzorku gDNA s minimální koncentrací extrakce 3,33 ng/µl. Stříhání vyžaduje konečný objem 52 µl (0,77 ng/µl) s minimálně 40 µl TEB (je součástí dodávky) jako ředidlo.

Skladování knihovny

Knihovny skladujte na low-bind deskách PCR 7 až 32 dní, v závislosti na typu knihovny (viz [Tabulka 5](#)).

Tabulka 5 Doba skladování knihovny

Typ knihovny	Deska	Počet dní	Skladovací teplota
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
Fragmentovaná gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
Před obohacením	ALS PCR	≤ 30	-25 °C až -15 °C
Po obohacení	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
PCR po obohacení	PL PCR	≤ 30	-25 °C až -15 °C
Normalizováno	NL PCR	≤ 32	-25 °C až -15 °C

Varování a preventivní opatření

Bezpečnost



VAROVÁNÍ

Tato sada reagensií obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Ventilace v místnosti musí být přiměřená pro manipulaci s nebezpečnými látkami v reagensiích. Používejte ochranné pomůcky, včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagensiemi nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a předpisy platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete v bezpečnostních listech (SDS) na stránce support.illumina.com/sds.html.

- Se všemi vzorky zacházejte tak, jako by byly infekční.
- Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejzte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagensiemi rozboru používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a reagensiemi rozboru si důkladně umyjte ruce.

Laboratorní informace

- Kontaminaci zabráníte tím, že v laboratoři zavedete jednosměrný pracovní postup. Oblasti před amplifikací a po amplifikaci musí mít své vlastní vybavení a materiál (např. pipety, špičky pipet, vortexová třepačka a odstředivka). Abyste zabránili přenosu amplifikačního produktu nebo sondy, když vstupujete do oblastí po amplifikaci, nevracejte se do oblastí před amplifikací.
- Proveďte kroky indexace PCR a obohacení v oblasti po amplifikaci, abyste zabránili přenosu amplifikačního produktu.
- Všechny postupy přípravy knihovny vyžadují prostředí prosté-RNáz/DNáz. Proveďte důkladnou dekontaminaci pracovních oblastí pomocí čisticího inhibujícího-RNázu/DNázu. Používejte plasty, které dle certifikace neobsahují DNázy, RNázy a lidskou genomovou DNA.
- U postupů po amplifikaci důkladně vyčistěte pracovní povrchy a vybavení před a po každém postupu čerstvě vyrobeným 0,5% roztokem chlornanu sodného (NaOCl). Nechte roztok působit na povrchu po dobu 10 minut a poté důkladně otřete 70% ethylalkoholem nebo isopropylalkoholem.
- Používejte zkumavky mikroadstředivky, desky, pipetové špičky a zásobníky bez nukleázy.
- Při práci s rozbořením používejte kalibrované vybavení. Ujistěte se, že v tomto protokolu používáte vybavení kalibrované na určenou rychlost, teplotu a objem.
- Používejte přesné pipety, abyste zajistili přesné dodání reagensií a vzorků. Pravidelně kalibrujte podle specifikací od výrobce.

- Při použití vícekanálových pipet dodržujte následující pokyny:
 - Pipetujte minimálně $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Ujistěte se, že bariérové špičky dobře pasují a jsou vhodné pro danou značku a model vícekanálových pipet.
 - Špičky upevňujte krouživým pohybem, abyste zajistili, že budou všechny dobře připevněné.
 - Nasávejte pod úhlem 90° se stejnou objemovou úrovní u všech špiček.
 - Promíchejte všechny složky pipetováním reakční směsi nahoru a dolů.
 - Po vypuštění se ujistěte, že se kapalina úplně vypustila ze všech špiček.
- Používejte vybavení určené pro rozbor a nastavte programy podle pokynů.
- Teploty vyznačené pro termocyklér a inkubátor mikrovzorků udávají teplotu reakce, nemusí nutně označovat nastavenou teplotu vybavení.

Rozbor

- Zabraňte křížové kontaminaci.
 - Při manipulaci se vzorky a reagensii dodržujte správné laboratorní postupy.
 - Pro odlišné vzorky nebo dispenzní reagentie používejte čerstvý laboratorní spotřební materiál a nepoužité pipetové špičky.
 - Používejte špičky odolné vůči aerosolům, které sníží riziko křížové kontaminace.
 - Při přesunu z oblasti před amplifikací do oblasti po amplifikaci používejte jednosměrný pracovní postup.
 - V jednu chvíli mějte otevřený pouze jeden indexační primer a pracujte jen s ním. Indexační zkumavku po použití ihned znovu uzavřete. V sadě se dodávají náhradní víčka.
 - Rukavice si měňte často a tehdy, když přijdou do styku s indexačními primery nebo vzorky.
 - Odstraňte nepoužité zkumavky s indexačním primerem z pracovní oblasti.
 - Reagentie nevracejte do zásobních zkumavek, pokud byly použity se stripem zkumavek, žlabem nebo zásobníkem.
 - Míchejte vzorky pipetou a odstřed'ujte desku podle toho, jak uvádí pokyny.
 - Používejte třepačku pro mikrodisky. Nemíchejte desky ve vortexové třepačce.
- Nezaměňujte složky rozboru za složky z jiných šarží sad reagentií. Šarže sad reagentií jsou uvedeny na štítku krabice sady reagentií a na hlavním listu šarže.
- Dodržujte postupy správné laboratorní praxe, aby nedošlo ke kontaminaci reagentií, nástrojů, vzorků a knihoven nukleázou či produkty PCR. Kontaminace nukleázou a produktem PCR může vést k nepřesným a nespolehlivým výsledkům.
- Pro optimální výkon rozboru a skladování je vyžadován správný typ desky. Dodržujte pokyny pro přenos desek, jež uvádí [Návod k použití na straně 38](#).
- Nedodržení uvedených postupů může vést k chybným výsledkům nebo významnému snížení kvality knihovny.

- Pokud [Návod k použití na straně 38](#) nestanovuje bod bezpečného přerušení, přejděte ihned k dalšímu kroku.
- Reagencie nebo komponenty rozboru uchovávejte při stanovené teplotě ve vyznačených oblastech před amplifikací a po amplifikaci.
- Neskladujte reagencie v nezmrazeném prostoru ani ve dveřních přihrádkách v chladničce.
- Nezmrazujte reagencie, které obsahují částice (LNB1, SPB a SMB).
- Nepoužívejte reagencie, které byly skladovány nesprávně.
- Neodchylujte se od postupů pro míchání a manipulaci určených pro jednotlivé reagenty. Nedostatečné nebo nadměrné promíchání reagentů ve vortexové třepačce se může projevit v podobě chybných výsledků vzorků.
- FSM, SSM, ERA1-B a TCB1 mohou obsahovat částice související s produktem. Dodržujte pokyny pro manipulaci s jednotlivými reagenty. Po provedení kroků míchání FSM a SSM nemají zbývající bílé částice související s produktem vliv na výkon.
- Připravte čerstvé hlavní směsi a zbývající objem po použití zlikvidujte.
- Na promývací kroky si vždy připravte čerstvý 80% ethanol s vodou prostou RNáz/DNáz. Ethanol může absorbovat vodu ze vzduchu, což potenciálně ovlivňuje výsledky. Po použití 80% ethanol zlikvidujte v souladu s předpisy v daném místě, zemi nebo oblasti.
- Přeneste určený objem eluátu. Přenos menšího než specifikovaného objemu eluátu během kroků eluačního postupu by mohl mít vliv na výsledky.
- Při použití ultrasonikátoru dodržujte následující pokyny. Dodržujte pokyny od výrobce.
 - Při přenášení gDNA do zkumavky ultrasonikátoru postupujte pomalu, abyste předešli tvorbě bublin. Nadměrné množství bublin nebo vzduchových kapes ve stříhací zkumavce by mohl způsobit neúplnou fragmentaci.
 - Vypouštění do zkumavky ultrasonikátoru provádějte pomalu, aby nedošlo k vystříknutí.
 - Vytlačení tekutiny a ztrátě vzorku zabráníte tím, že při odstraňování fragmentované DNA nebudete umisťovat špičku pipety na dno zkumavky ultrasonikátoru.
- Nepipetujte méně než 2 µl vstupního vzorku.
- Žlab nepoužívejte k dávkování reagentů u kroků vyžadujících přidat do jamek na vzorky méně než 10 µl materiálu.
- K přenosu fragmentovaných vzorků gDNA ze zkumavek ultrasonikátoru na desku přípravy knihovny (LP) používejte pipetu s jemnou špičkou.
- Nekombinujte adaptéry SUA1 a UMI.
- Adaptéry SUA1 používejte se vzorky RNA.
- Adaptéry UMI používejte se vzorky DNA.
- Ke každému vzorku knihovny přiřadte různé indexové primery, které jednoznačně identifikují každou knihovnu, když je ve fondu pro sekvenování v jedné průtokové kyvetě.

- Nekombinujte indexační primery CPxx a UPxx ve stejné knihovně.
- Rozdíly mezi vzorky a indexačními primery způsobí, že se z důvodu špatné identifikace pozitivních vzorků vykáží nesprávné výsledky. Než začnete připravovat knihovnu, zadejte ID vzorků a přiřaďte indexy zde: Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Při přípravě knihovny si pro referenci poznamenejte ID vzorků, indexaci a orientaci jamek desky.
- Pro knihovny odvozené od vzorků RNA používejte pouze indexy UPxx.
- Pro knihovny odvozené od vzorků DNA používejte indexy UPxx nebo CPxx.
- Sekvenujte maximálně 8 knihoven RNA a 8 knihoven DNA na průtokovou kyvetu. Sekvenujte minimálně tři knihovny. Dodržujte pokyny v části [Počet knihoven a výběr indexů na straně 35](#).
- Po kroku vazby v části [První zachycení cílů na straně 59](#) a v části [Druhé zachycení cílů na straně 63](#) přejděte ihned ke kroku mytí, aby nedošlo k vysušení shluků částic.
- Během kroků mytí odstraňte ze dna jamek veškerý 80% ethanol. Bylo prokázáno, že zbytkový etanol ovlivňuje výsledky.
- Pro optimální výkon rozboru dodržujte určený počet mytí uvedený v [Návod k použití na straně 38](#).
- Během postupu [Normalizace knihoven na straně 70](#) proveďte důkladnou resuspendaci shluku částic, aby bylo dosaženo konzistentní hustoty klastru na průtokové kyvetě.
- Neprodleně nahlase veškeré závažné události související s tímto produktem společnosti Illumina a příslušným orgánům členských států, ve kterých uživatel a pacient sídlí.

Poznámky k postupu

- Pracovní postup TSO Comprehensive (EU) lze provádět podle následujícího harmonogramu:
 - Den 1: Syntéza cDNA ze vzorků RNA, fragmentace DNA ze vzorků gDNA, příprava knihovny a zahájení (první) hybridizace přes noc.
 - Den 2: Obohacení, normalizace obohacených knihoven a vložení knihoven do Přístroj NextSeq 550Dx.Pokud není možné provést pracovní postup TSO Comprehensive (EU) podle tohoto harmonogramu, je v celém protokolu specifikováno několik bodů bezpečného přerušení. Pokud v protokolu není stanoven bod bezpečného přerušení, přejděte ihned k dalšímu kroku.
- Knihovny odvozené ze vzorků RNA a DNA je možné připravovat současně v samostatných jamkách.
- Tabulka pro přípravu hlavní směsi obsahuje objemové přebytky, aby bylo zajištěno, že je k dispozici dostatečný objem pro množství zpracovávaných vzorků.
- Použijte vodu na molekulární úrovni, která neobsahuje nukleázy.
- Po přidání reagentie špičku jedenkrát opláchněte nasátím a vypuštěním do příslušné jamky na desce, pokud v postupu není uvedeno jinak.
- Pokojová teplota je definována jako 15 °C až 30 °C.

- Reagencie, vzorky a knihovny je nutné v určitých krocích uvedených v návodu k použití uchovávat v chladu. To se definuje jako uchovávání na ledu nebo jeho ekvivalentu.

Programy termocykléru

- Programování termocykléru na vybavení požadované před amplifikací a po amplifikaci je nutné provést před zahájením protokolu.
- Zkontrolujte, že se desky PCR bezpečně vejdou do termocykléru.
- Použijte desky doporučené výrobcem termocykléru.

Zapečetění a odpečetění desky

- Desky vždy utěsňujte pomocí nového lepicího těsnění. Nepoužívejte těsnění opakovaně.
- Pro utěsnění desky pevně umístěte lepicí kryt na desku pomocí těsnicího klínu nebo válečku.
- Desku s 96 jamkami před provedením následujících kroků protokolu vždy utěsněte pomocí nového lepicího těsnění.
 - Postup míchání desky v třepačce
 - Kroky odstředování
 - Kroky teplotního cyklování
 - Hybridizace
 - Dlouhodobé skladování
- Zajistěte, aby okraje a jamky byly utěsněné. Sníží se tím riziko křížové kontaminace a odpařování.
- Položte desku na rovný povrch a poté opatrně sejměte těsnicí fólii.
- Pokud je před odpečetěním pozorována na těsnění nebo bočních stěnách jamek jakákoliv kapalina, odstřed'ujte desku při 280 g po dobu 1 minuty.
- Používejte lepicí těsnění s účinností v rozmezí teplot $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a vhodné pro desky PCR s lemem nebo polovičním lemem.

Vybavení

- Před zahájením rozboru se ujistěte, že jsou pracovníci laboratoře seznámeni s pokyny výrobce pro obsluhu a údržbu veškerého zařízení.

Typ desky a přenosy desek

- Pro optimální výkon rozboru a skladování je vyžadován správný typ desky.
- Při přenosu objemů mezi deskami přenášejte určený objem z jednotlivých jamek na desce do odpovídající jamky na cílové desce.
- Vícekanálové pipety lze použít při přenosu vzorků mezi zkumavkami nebo deskami.

- Při míchání desek v třepačce dodržujte následující pokyny.
 - K míchání desek v třepačce použijte deskovou třepačku. Nemíchejte desky ve vortexové třepačce.
 - Desky PCR míchejte v třepačce při 1 200 ot./min.
 - Desky MIDI míchejte v třepačce při 1 800 ot./min.
 - Postupujte podle pokynů výrobce, abyste se ujistili, že třepačka desky pevně drží.

Odstředování

- Když pokyny v protokolu vyžadují krátké odstředování, odstředujte při 280 g po dobu 1 minuty.
- Pokud se na těsnění nebo na stěnách jamky objeví kapalina, odstředujte desku při 280 g po dobu 1 minuty.

Nakládání s reagensiemi

- Všechny zkumavky s reagensiemi je nutné po použití pevně zavíčkovat, aby se omezilo odpařování a zabránilo kontaminaci.
- Jakmile nejsou reagensie během postupu dále vyžadovány, opět je uskladněte při požadované skladovací teplotě.
- Při přípravě reagensií, která se provádí před každou částí postupu, dodržujte [Návod k použití na straně 38](#).
- Zajistěte přípravu požadovaného objemu hlavní směsi, eluční směsi a 80% ethanolu pro zpracováváný počet vzorků.
- Objemy uvedené v tabulkách pro hlavní směs a roztok zahrnují objemové přebytky. Výpočty objemových přebytků probíhají následujícím způsobem.
 - [Tabulka 14](#)
 - $\text{Objem FSM} = (7,2 \mu\text{l}) \times (\text{počet vzorků} + \text{kontrol}) \times (1,25).$
 - $\text{Objem RVT} = (0,8 \mu\text{l}) \times (\text{počet vzorků} + \text{kontrol}) \times (1,25).$
 - [Tabulka 21](#)
 - $\text{Objem ERA1-B} = (7,2 \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (1,20).$
 - $\text{Objem ERA1-A} = (2,8 \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (1,20).$
 - [Tabulka 29](#)
 - $\text{Objem EE2} = (20,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (1,364).$
 - $\text{Objem HP3} = (1,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (1,364).$
 - [Tabulka 30](#)
 - $\text{Objem EE2} = (20,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (1,364).$
 - $\text{Objem HP3} = (1,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (1,364).$
 - [Tabulka 36](#)
 - $\text{Objem LNA1} = (38,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (2,0).$
 - $\text{Objem LNB1} = (6,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (2,0).$

- **Tabulka 37**
 - Objem EE2 = $(30,4 \text{ } \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (1,25)$.
 - Objem HP3 = $(1,6 \text{ } \mu\text{l}) \times (\text{počet knihoven}) \times (1,25)$.

Sady adaptérů

- Rozbor TSO Comprehensive (EU) obsahuje adaptéry SUA1 a UMI.
- Adaptéry SUA1 se používají se vzorky RNA. Nejsou určeny k použití se vzorky DNA.
- Adaptéry UMI se používají se vzorky DNA. Nejsou určeny k použití se vzorky RNA.

Nakládání s částicemi

- V rozboru TSO Comprehensive (EU) se vyskytují tři typy částic (SPB, SMB a LNB1). Ujistěte se, že se během procedury bude používat správný typ částice.
- S každým typem částic provádějte správný počet mytí.
- Zajistěte, aby byly částice před použitím ponechány při pokojové teplotě.
- Pro zajištění homogenity míchejte před použitím částice po dobu 1 minuty.
- Při míchání částic pipetou dodržujte následující pokyny:
 - Při míchání použijte vhodnou pipetu a velikost špičky pro daný míchaný objem.
 - Nastavte objem na přibližně 50–75 % objemu vzorku.
 - Pipetujte pomalu, aniž byste uvolnili píst.
 - Zabraňte vystříknutí a nasátí bublin.
 - Umístěte špičku pipety nad částici a vypouštějte přímo do částice, aby se částice z jamky nebo zkumavky uvolnily.
 - Zajistěte, aby se celý shluk částic dostal do roztoku. Roztok by měl mít tmavě hnědou barvu a homogenní konzistenci.
 - Zkontrolujte, zda se vytvořil shluk částic. Opatrně nasajte celý roztok částic do špičky pipety a zkontrolujte dno jamek.
- Pokud během postupu magnetické separace dojde k nasátí částic do pipetových špiček, vypusťte částice zpět do jamky na desce na magnetickém stojanu. Než budete pokračovat v dalším kroku postupu, vyčkejte, dokud kapalina nebude čirá (přibližně 2 minuty).
- Při mytí částic:
 - Použijte doporučený magnetický stojan pro danou desku.
 - Kapalinu vypouštějte přímo na desku, aby se zvlhčily částice po stranách jamek.
 - Ponechte desku na magnetickém stojanu, dokud postup nebude vyžadovat její odebrání.
 - Nemíchejte desku, dokud je na magnetickém stojanu.
 - Pokud je na magnetickém stojanu, nenarušujte částicové shluky.

- Při promývání částic nebo odstraňování supernatantu naklánějte špičky pipet na dně jamek, aby se nevytvořilo vakuum a nedošlo k nasátí roztoku do filtrů pipetových špiček.

Počet knihoven a výběr indexů

Před nastavením běhu naplánujte počet knihoven vzorků a indexů vzorků pro běh sekvenování. Následující pokyny pro počet vzorků zahrnují pozitivní kontroly, ale nevyužívají negativní kontroly nebo kontroly bez templátu (NTC). Jako další vzorek musí být k plánovanému běhu přidány snímače NTC.

Při TSO Comprehensive (EU) postupujte podle pokynů, jež uvádí [Tabulka 6](#) a [Tabulka 7](#) ke stanovení počtu knihoven RNA a/nebo DNA k sekvenaci v jedné průtokové kyvetě. Pokud sekvenujete knihovny RNA *nebo* DNA odděleně, viz [Tabulka 6](#). Pokud sekvenujete knihovny RNA a DNA na stejné průtokové kyvetě, viz [Tabulka 7](#).

Tabulka 6 Sekvenování knihoven RNA *nebo* DNA

Typ knihovny	Minimum*	Maximum*
Pouze RNA	3	16
Pouze DNA	3	8

* NTC nepřispívají k plexitě.

Tabulka 7 Sekvenování knihoven RNA a DNA na stejné průtokové kyvetě

Typ knihovny	Minimum*	Maximum*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC nepřispívají k plexitě.

Pro *optimální* využití reagensů při sekvenování DNA a RNA knihoven sTSO Comprehensive (EU), které provádí Přístroj NextSeq 550Dx, sekvenujte 8 knihoven RNA a 8 knihoven DNA na průtokovou kyvetu.

Indexační primery jednoznačně identifikují každý vzorek tak, že knihovny mohou být ve společném fondu pro sekvenování na jedné průtokové kyvetě. Kombinace kompatibilních indexů se zobrazují na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) při nastavení běhu (Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)). Během přípravy knihovny přidejte do každé knihovny vzorků indexační primer. *Pro každou knihovnu vzorků použijte jinou směs indexačních primerů.*

Ujistěte se, že indexační primery, které používáte se vzorky, odpovídají indexům, k jejichž výběru pro analýzy používáte Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). *Neodpovídající indexy způsobí, že se z důvodu špatné identifikace pozitivních vzorků vykážou nesprávné výsledky.*

V rozboru TSO Comprehensive (EU) existují dva typy indexů.

- **Indexy UPxx** – Indexy UPXX používejte pro knihovny odvozené od vzorků RNA nebo DNA.
- **Indexy CPxx** – Indexy CPxx používejte pro knihovny odvozené od vzorků DNA. Indexy CPxx nepoužívejte pro knihovny odvozené od RNA nebo při sekvenování celkem pouze tří knihoven DNA.

Při sekvenování pouze tří knihoven platí následující požadavky:

- Knihovny musí být buď všechny DNA, nebo všechny RNA.
- Nepoužívejte indexové sady CPxx.
- K zajištění dostatečné diverzity je vyžadována jedna z následujících indexových sad UPxx:
 - UP01, UP02 a UP03
 - UP04, UP05 a UP06
 - UP07, UP08 a UP09
 - UP10, UP11 a UP12

První knihovna má například přiřazen index UP01, druhá knihovna UP02 a třetí knihovna UP03.

TruSight Oncology Kontroly

TSO Comprehensive (EU) vyžaduje Kontrolní vzorky TruSight Oncology, které se skládají z DNA kontroly TruSight Oncology a RNA kontroly TruSight Oncology jakožto pozitivních kontrol. V rámci dané události přípravy knihovny zahrňte pro každý běh sekvenování DNA TruSight Oncology kontrolu DNA a pro každý běh sekvenování RNA TruSight Oncology kontrolu RNA (zahrňte také kontrolní vzorky pro kombinovaný běh DNA a RNA). Pro každý plánovaný běh sekvenování je připravena jedinečná pozitivní kontrola. Další informace viz Příbalový leták ke kontrolním vzorkům TruSight Oncology (dokument č. 200009919).

Vstupní množství pozitivní kontroly je 40 ng pro DNA a RNA.

Zahrňte příslušnou kontrolu DNA bez templátu (NTC) do každé události přípravy knihovny RNA a DNA. V rámci jedné události přípravy knihovny probíhá sekvenování NTC opakovaně. Postupujte podle těchto pokynů pro Kontrolní vzorky TruSight Oncology:

- Knihovny z pozitivních kontrol a kontrol bez templátu připravujte u vzorků identicky.
- Pro DNA NTC používejte TEB.
- Pro RNA NTC používejte vodu prostou DNáz/RNáz.
- V požadavku na maximální knihovny jsou zahrnuty pozitivní kontroly.
- V požadavku na minimální knihovny nejsou zahrnuty NTC.
- Při sekvenování pouze 3 knihoven použijte UP indexy pro NTC.
- Vzhledem k tomu, že NTC je sekvenována opakovaně, nemohou se indexy vybrané pro tuto kontrolu v události přípravy knihovny opakovat.

Následující tabulky ukazují příklad rozložení desek pro přípravu knihovny. Každý číslovaný sloupec představuje jeden běh sekvenování. Při společném sekvenování knihoven DNA a RNA představuje každá odpovídající sada sloupců jeden běh sekvenování (například sloupec 1 a sloupec 7). Pro každý sloupec nebo sadu sloupců se sekvenuje NTC.

Tabulka 8 Událost přípravy knihovny pro jeden běh, která obsahuje šest vzorků pacientů

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pozitivní kontrola DNA	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	Pozitivní kontrola RNA
B	DNA 1	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	RNA 1
C	DNA 2	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	RNA 2
D	DNA 3	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	RNA 3
E	DNA 4	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	RNA 4
F	DNA 5	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	RNA 5
G	DNA 6	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	RNA 6
H	DNA NTC	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	prázdné	RNA NTC

Tabulka 9 Událost přípravy knihovny pro tři běhy, která obsahuje 20 vzorků pacientů

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

Návod k použití

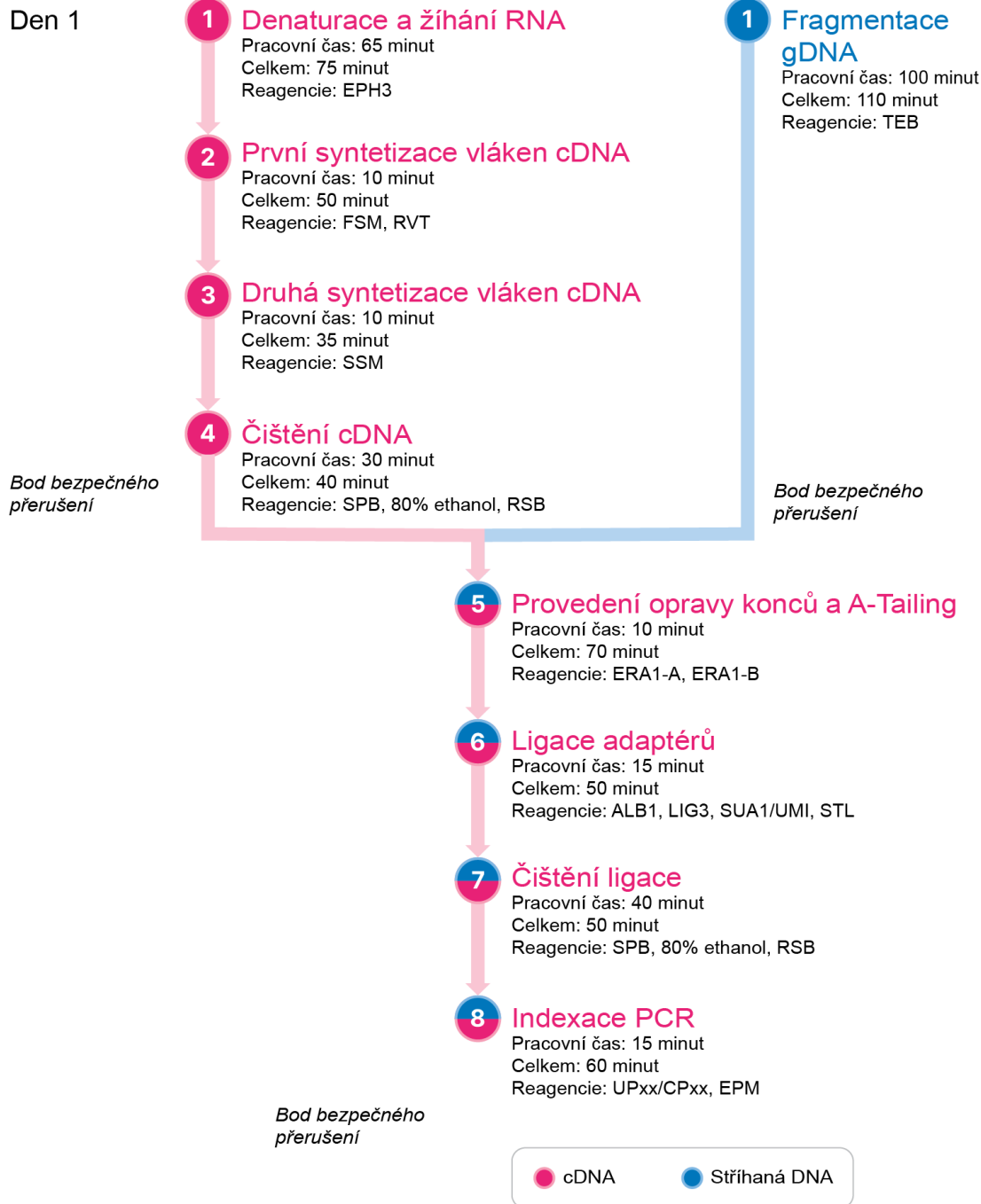
Přehled pracovního postupu TSO Comprehensive (EU) znázorňují [Obrázek 1](#) a [Obrázek 2](#).

Pracovní postup přípravy knihovny

[Obrázek 1](#) znázorňuje pracovní postup přípravy knihovny pro TSO Comprehensive (EU). Knihovny ze vzorků RNA a DNA je možné připravovat současně v samostatných jamkách. Pozitivní kontroly a kontroly bez templátu se u vzorků zpracovávají identicky. Mezi kroky jsou vyznačeny body bezpečného přerušení.

Před spuštěním protokolu zadejte informace o běhu a vzorku do: Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Viz *Průvodce pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661).

Obrázek 1 TSO Comprehensive (EU) Pracovní postup (část 1)

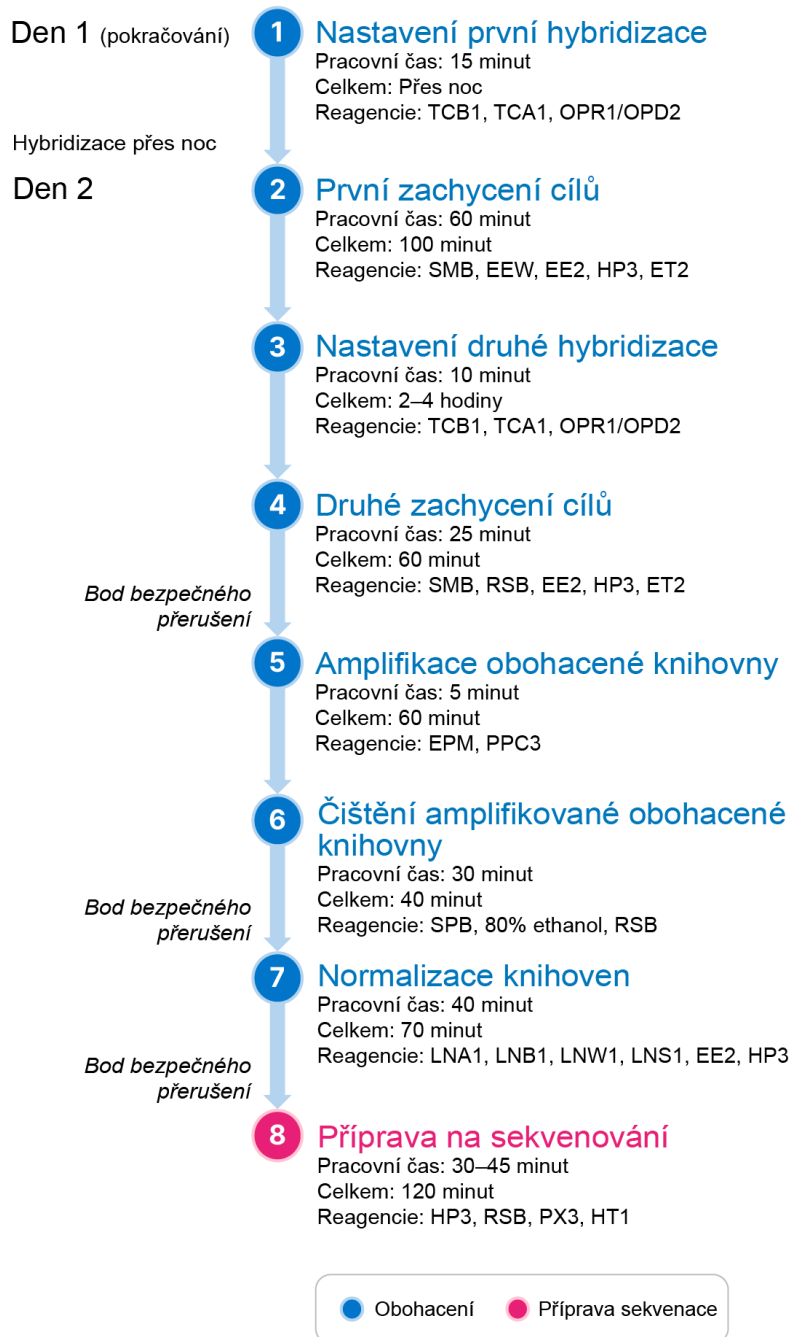


* Pracovní čas a celkový čas udává přibližné hodnoty.

Pracovní postup obohacení

Obrázek 2 znázorňuje pracovní postup obohacení pro TSO Comprehensive (EU). Mezi kroky jsou vyznačeny body bezpečného přerušení.

Obrázek 2 Pracovní postup TSO Comprehensive (EU) (část 2)



Programování termocyklérů

Před zahájením rozboru uložte následující programy na termocyklér před amplifikací a termocyklér po amplifikaci.

Tabulka 10 Programy termocykléru před amplifikací

Krok postupu	Název programu	Teplota víčka	Objem reakce	Parametry termocykléru
Denaturace a žíhání RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	65 °C po dobu 5 minut 4 °C po dobu 1 minuty - Udržujte při teplotě 4 °C.
První syntetizace vláken cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	25 °C po dobu 10 minut 42 °C po dobu 15 minut 70 °C po dobu 15 minut 4 °C po dobu 1 minuty - Udržujte při teplotě 4 °C.
Druhá syntetizace vláken cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	16 °C po dobu 25 minut 4 °C po dobu 1 minuty - Udržujte při teplotě 4 °C.

POZNÁMKA Pokud teplotu víčka pro 2ndSS nelze nastavit na 30 °C, vypněte možnost přehřátí víčka.

Tabulka 11 Programy termocykléru po amplifikaci

Krok postupu	Název programu	Teplota víčka	Objem reakce	Parametry termocykléru
Indexace PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	98 °C po dobu 30 sekund 15 cyklů: 98 °C po dobu 10 sekund 60 °C po dobu 30 sekund 72 °C po dobu 30 sekund 72 °C po dobu 5 minut - Udržujte při teplotě 10 °C.
Provedení první hybridizace	HYB1	100 °C	50 µl	95 °C po dobu 10 minut 85 °C po dobu 2 minut 30 sekund 75 °C po dobu 2 minut 30 sekund 65 °C po dobu 2 minut 30 sekund - Udržujte teplotu 57 °C po dobu 8 až 24 hodin

Krok postupu	Název programu	Teplota víčka	Objem reakce	Parametry termocykléru
Provedení druhé hybridizace	HYB2	100 °C	50 µl	95 °C po dobu 10 minut 85 °C po dobu 2 minut 30 sekund 75 °C po dobu 2 minut 30 sekund 65 °C po dobu 2 minut 30 sekund - Udržujte teplotu 57 °C po dobu 1,5 až 4 hodin
Amplifikace obohacené knihovny	EL-PCR	100 °C	50 µl	98 °C po dobu 30 s 18 cyklů: 98 °C po dobu 10 s 60 °C po dobu 30 s 72 °C po dobu 30 s 72 °C po dobu 5 min. - Udržujte při teplotě 10 °C.

Příprava na protokol

Tato příprava je nutná k provedení kroků protokolu vedoucích k dalšímu bodu bezpečného přerušení.



UPOZORNĚNÍ

Všechny postupy v pracovním postupu vyžadují prostředí prosté RNázu/DNázu.

1. Proveďte důkladnou dekontaminaci pracovních oblastí pomocí čistidla inhibujícího RNázu/DNázu.
2. Zkontrolujte, že jsou nastaveny programy termocykléru před amplifikací. Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
3. Nastavte ultrasonikátor podle pokynů od výrobce.
4. Pokud zpracováváte pouze vzorky DNA, přejděte přímo ke kroku [Fragmentace gDNA na straně 48](#).
5. Vyjměte kontroly RNA ze skladovacích prostor.
6. Vyjměte z krabice zkumavky s reagenty a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (PN 20031127)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
EPH3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Denaturace a žíhání RNA
FSM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	První syntetizace vláken cDNA
RVT	-25 °C až -15 °C	Uchovávejte v chladu.	První syntetizace vláken cDNA
SSM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Druhá syntetizace vláken cDNA

Tabulka 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (chlazení) (PN 20031119)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
SPB (světle zelený štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	Čištění cDNA
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Čištění cDNA

Denaturace a žíhání RNA

Tento proces denaturuje purifikovanou RNA a provede priming náhodnými hexamery pro přípravu na syntézu cDNA.

Příprava

- Připravte následující reagenty.
 - EPH3 – Odložte.
 - FSM – Promíchejte ve vortexové třepačce. Krátce odstředte a pipetováním promíchejte. Reagenty může obsahovat bílé částice související s produktem. Uživatel nemusí provést žádnou akci. Na účinnost produktu to nemá žádný vliv.
 - RVT – Krátce odstředte a pipetováním promíchejte. Uchovávejte v chladu.

POZNÁMKA RVT je viskózní roztok. Při pipetování minimalizujte tvorbu bublin.

- Ve zkuševce mikroodstředivky nakombinujte následující objemy, abyste si připravili hlavní směs FSM + RVT.

Tabulka 14 Hlavní směs FSM + RVT*

Složka hlavní směsi	4 knihovny (µl)	8 knihoven (µl)	16 knihoven (µl)	24 knihoven (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části [Nakládání s reagenty na straně 33](#).

- Pipetováním 10krát promíchejte.
- Hlavní směs FSM + RVT uchovávejte v chladu, dokud nepřejdete ke kroku [První syntetizace vláken cDNA na straně 44](#).

Postup

- Extrahované vzorky RNA a kontrolní vzorky RNA udržujte při rozmrazování v chladu. Pro zbytek protokolu zpracováváte kontroly RNA jako vzorky.

2. Pokud RNA nepoužíváte, uchovávejte ji v chladu. Kvantifikaci vzorků naleznete v části [Požadavky vzorků na straně 26](#).
3. Pipetováním každý vzorek RNA 10krát promíchejte.
4. Pro přípravu 40 ng každého vzorku RNA použijte vodu prostou RNáz/DNáz s konečným objemem 8,5 µl (4,7 ng/µl).
Pro kontroly RNA použijte koncentraci uvedenou na štítku zkumavky.
5. Označte novou 96jamkovou desku PCR jako CF (Fragmenty cDNA).
6. Přidejte 8,5 µl každého vzorku RNA do jedinečné jamky na desce CF PCR.
7. Zajistěte, aby rozložení desky se vzorky a indexy jednotlivých vzorků odpovídaly běhu, který jste si během nastavení běhu naplánovali zde: Analytický modul TSO Comprehensive (EU).
8. Míchejte EPH3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
9. Přidejte 8,5 µl EPH3 do každé jamky vzorku.
10. Na desku CF PCR přilepte těsnění.



UPOZORNĚNÍ

Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.

11. Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 1 minuty.
12. Odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
13. Vložte na termocyklér a spusťte program LQ-RNA.
Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
14. Když vzorky dosáhnou teploty 4 °C, udržujte je při této teplotě 1 minutu. Přejděte ihned k dalšímu kroku.

První syntetizace vláken cDNA

Tento proces provádí reverzní přepis fragmentů RNA z primingu náhodnými hexamery do cDNA prvních vláken pomocí reverse transcriptase.

Postup

1. Odeberte desku CF PCR z termocykléru.
2. Pipetováním 10krát promíchejte hlavní směs FSM + RVT. Ujistěte se, že směs FSM + RVT je zcela homogenní.
3. Přidejte 8 µl hlavní směsi FSM + RVT do každé jamky vzorku.
4. Pipetováním 10krát promíchejte.
5. Zlikvidujte zbývající hlavní směs FSM + RVT.
6. Na desku CF PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
7. Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 1 minuty.

8. Odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
9. Vložte na termocyklér a spusťte program 1stSS.
Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
10. Když vzorky dosáhnou teploty 4 °C, pokračujte ihned dalším krokem.
Vzorky prvních vláken lze uchovávat při teplotě 4 °C po dobu 5 minut.

Druhá syntetizace vláken cDNA

Tento proces odstraňuje templát RNA a syntetizuje dvouvláknovou cDNA.

Příprava

1. Připravte SSM:
 - a. Promíchejte 10krát v překlopné třepačce.
 - b. Krátce odstřed'ete. Reagencie může obsahovat bílé částice související s produktem. Není nutná žádná akce. Na účinnost produktu to nemá žádný vliv.

Postup

1. Odeberte desku CF PCR z termocykléru.
2. Přidejte 25 µl SSM do každé vzorkové jamky.
3. Na desku CF PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
4. Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 1 minuty.
5. Odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
6. Vložte na termocyklér a spusťte program 2ndSS.
Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
7. Když vzorky dosáhnou teploty 4 °C, vyčkejte 1 minutu a poté ihned pokračujte dalším krokem.

Čištění cDNA

Tento proces používá SPB k vyčištění nežádoucích reakčních složek z cDNA. Částice se dvakrát promyjí v čerstvém 80% ethanolu. cDNA je eluována s RSB.

Příprava

1. Připravte následující reagencie.
 - SPB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - RSB – Odložte pro účely postupu.
2. Připravte čerstvý 80% EtOH do 15ml nebo 50ml kónické zkumavky následovným způsobem.

Tabulka 15 Připravte čerstvý 80% ethanol

Reagencie	4 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven
100% ethanol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Voda prostá RNáz/DNáz	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- Promíchejte čerstvý 80% ethanol ve vortexové třepačce.
- Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako BIND1 (Pro vazbu cDNA).
- Zakryjte a odložte.
- Připravte magnet.

Postup

Vazba

- Odeberte desku CF PCR z termocykléru.
- Míchejte SPB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.
- Ihned přidejte 90 µl SPB do každé jamky vzorku na desce BIND1 MIDI.
Pokud k dávkování SPB používáte žlab, započítejte při dávkování dostatečného množství materiálu na každý vzorek faktor přebytku#1,15. Po přidání SPB do každé jamky pro vzorek zlikvidujte veškerý zbývající materiál.
- Přeneste celý objem (50 µl) jednotlivých vzorků z desky CF PCR do odpovídající jamky desky BIND1 MIDI.
- Zlikvidujte prázdnou desku CF PCR.
- Na desku BIND1 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
- Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
- Umístěte desku BIND1 MIDI na magnetický stojan na dobu 5 minut.
- Desku z magnetického stojanu neodobírejte. Aniž byste narušili shluk částic, pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z jednotlivých vzorkových jamek veškerý supernatant.

Mytí

- Promyjte částice následujícím způsobem.
 - Ponechte desku BIND1 MIDI na magnetickém stojanu a přidejte do každé jamky 200 µl čerstvého 80% ethanolu.
 - Počkejte 30 sekund.
 - Aniž byste narušili shluk částic, pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z jednotlivých vzorkových jamek veškerý supernatant.
- Promyjte částice **podruhé**.

3. Pipetou s jemnou špičkou odstraňte z každé jamky zbytky ethanolu.
4. Zlikvidujte nepoužitý 80% ethanol.

Eluování

1. Odeberte desku BIND1 MIDI z magnetického stojanu.
2. Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
3. Přidejte 22 µl RSB do každé vzorkové jamky.
4. Na desku BIND1 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
5. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
6. Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
7. Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
8. Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako PCF (Fragmenty vyčištěné cDNA).
Pokud místem, kde končíte, je [BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ na straně 47](#), použijte desku PCR.
9. Přeneste 20 µl eluátu z jednotlivých vzorkových jamek desky BIND1 MIDI do odpovídajících jamek na desce PCF.
10. Zlikvidujte prázdnou desku BIND1 MIDI.
11. Do každé vzorkové jamky na desce PCF přidejte 30 µl RSB.
12. Pipetováním 10krát promíchejte.
13. Přilepte na desku PCF těsnění a uložte ji do chladu.
14. Opět uskladněte EPH3, FSM, RVT a SSM.
15. Pokud zpracováváte vzorky derivované pouze z RNA (cDNA) a nezastavíte v bodě bezpečného přerušení, postupujte podle části [Provedení opravy konců a A-Tailing na straně 51](#).

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, odstřed'ujte desku PCF PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C až 7 dní.

Příprava na protokol

Tato příprava je nutná k provedení kroků protokolu vedoucích k dalšímu bodu bezpečného přerušení.

1. Vyjměte kontroly DNA ze skladovacích prostor.
2. Vyjměte z krabice zkumavku s reagentií a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (chlazení) (PN 20031119)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
TEB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Fragmentace gDNA

Fragmentace gDNA

Tento proces provádí fragmentaci gDNA a generuje fragmenty dsDNA se 3' nebo 5' převisy.

Příprava

1. Při kvantifikaci vzorků dodržujte doporučení v části [Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27](#).
2. Připravte TEB – Promíchejte v překlopné nebo vortexové třepačce.

Postup

Příprava desky

Pro přípravu desky zvolte jednu z následujících možností:

- Vzorky gDNA zpracovávejte současně se vzorky cDNA na desce PCF MIDI.
 - a. Označte desku PCF MIDI jako LP (Příprava knihovny).
 - b. Uchovávejte v chladu a odložte pro použití v kroku [Přenos fragmentované DNA na straně 49](#).
- Vzorky gDNA zpracovávejte současně se vzorky cDNA. Deska PCF PCR je zmrazená.
 - a. Rozmrazte desku PCF PCR na pokojovou teplotu.
 - b. Odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
 - c. Pipetováním 10krát promíchejte.
 - d. Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako LP (Příprava knihovny).
 - e. Přeneste všech 50 µl každého vzorku z desky PCF PCR do odpovídající jamky na desce LP MIDI.
 - f. Zlikvidujte desku PCF PCR.
 - g. Přilepte těsnění a uchovávejte v chladu až do kroku [Přenos fragmentované DNA na straně 49](#).
- Zpracujte vzorky pouze s gDNA.
 - a. Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako LP (Příprava knihovny).

Pokud místem, kde končíte, je [BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ na straně 49](#), použijte desku PCR.
 - b. Zakryjte a odložte pro použití v kroku [Přenos fragmentované DNA na straně 49](#).

Ředění gDNA

1. Rozmrazte vzorky gDNA a kontroly DNA při pokojové teplotě.
2. Pipetováním každý vzorek gDNA 10krát promíchejte.
3. Zkumavku krátce odstřed'te, aby se shromáždily kapky.
4. Promíchejte TEB v překlopné nebo vortexové třepačce.
5. Pro přípravu každého vzorku gDNA použijte TEB s konečným objemem 52 µl. V následující tabulce jsou uvedena vstupní množství a minimální koncentrace na základě typu vzorku.

- Rozbor vyžaduje minimální koncentraci extrakce, aby bylo možné použít alespoň 40 µl TEB z objemu 52 µl.
- Pro kontroly DNA použijte koncentraci uvedenou na štítku zkumavky.
- Aby se předešlo ztrátě vzorku, nepipetujte do tohoto ředění méně než 2 µl vzorku.

Typ vzorku	Vstupní množství (ng)	Minimální koncentrace (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrola	40	Viz štítek zkumavky

Fragmentace

1. Přidejte 52 µl z každého vzorku gDNA do samostatné jamky zkumavky ultrasonikátoru.



UPOZORNĚNÍ

Přemísťování gDNA do zkumavky provádějte pomalu, abyste zajistili, že ve spodní části zkumavky nezůstávají vzduchové kapsy. Další informace naleznete v části [Rozbor na straně 29](#) a v pokynech od výrobce.

2. Zaznamenejte orientaci proužku.
3. Pomocí ultrasonikátoru fragmentujte gDNA na fragmenty.

Přenos fragmentované DNA

1. Zajistěte, aby rozložení desky se vzorky a indexy jednotlivých vzorků odpovídaly běhu, který jste zvolili pro analýzu zde: Analytický modul TSO Comprehensive (EU).
2. Obnovte vzorek podle pokynů od výrobce ultrasonikátoru.
U některých typů zkumavek ultrasonikátoru se za účelem konsolidace vzorku ve zkumavce vyžaduje centrifugace.
3. Pro každý fragmentovaný vzorek gDNA použijte pipetu s jemnou špičkou k provedení třech transferů 16,7 µl do prázdné jamky na desce LP MIDI.
4. Na desku LP MIDI přilepte těsnění.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, přilepte na desku LP PCR těsnění a odstředujte při 280 g po dobu 1 minuty. Skladujte při teplotě -25 °C až -15 °C maximálně 7 dní.

Příprava na protokol

Tato příprava je nutná k provedení kroků protokolu vedoucích k dalšímu bodu bezpečného přerušení.

Zkontrolujte, že jsou nastaveny programy termocykléru po amplifikaci. Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).

1. Připravte kbelík na led nebo ekvivalent.
2. Vyjměte z krabice zkumavky s reagenty a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (mrazení) (PN 20031118)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
ERA1-A	-25 °C až -15 °C	Uchovávejte v chladu.	Provedení opravy konců a A-Tailing
ERA1-B	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Provedení opravy konců a A-Tailing
ALB1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Ligace adaptérů
LIG3	-25 °C až -15 °C	Uchovávejte v chladu.	Ligace adaptérů
SUA1 (modré víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Ligace adaptérů
UMI (bílé víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Ligace adaptérů
STL	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Ligace adaptérů
EPM	-25 °C až -15 °C	Uchovávejte v chladu.	Indexace PCR

Tabulka 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (chlazení) (PN 20031119)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
SPB (světle zelený štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	Čištění ligace
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Čištění ligace

Tabulka 19 Krabice TruSight Oncology Comp UP Index Primers (PN 20031120)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
UPxx	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte příslušné zkumavky s indexačním primerem na pokojovou teplotu.	Indexace PCR

Tabulka 20 Krabice TruSight Oncology Comp CP Index Primers (PN 20031126)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
CPxx	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte příslušné zkumavky s indexačním primerem na pokojovou teplotu.	Indexace PCR

Provedení opravy konců a A-Tailing

Tento proces opravuje převisy, které vznikají z fragmentace do konců s převislým A-tailem, pomocí hlavní směsi pro End Repair A-Tailing (ERA1).

3' až 5' exonukleáza v této směsi odstraňuje 3' převisy a 5' až 3' polymerázová aktivita vyplňuje 5' převisy. 3' konce dostávají během této reakce A-tail, aby se předešlo vzájemné ligaci během adaptérové ligační reakce.

Příprava

- Předehřejte dva mikrovzorkové inkubátory s vyhřívacími vložkami MIDI následujícím způsobem.
 - Předehřejte mikrovzorkový inkubátor na 30 °C.
 - Předehřejte mikrovzorkový inkubátor na 72 °C.
- Připravte následující reagencie.
 - ERA1-A – Krátce odstřed'te a pipetováním promíchejte. Uchovávejte v chladu.
 - ERA1-B – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te. Zkontrolujte sraženiny. Pokud jsou přítomné, zahřejte zkumavku na 37 °C a následně pipetováním promíchejte, dokud se sraženiny nerozpustí.
- Připravte hlavní směs ERA1 v mikrocentrifugační zkumavce.

Tabulka 21 Hlavní směs ERA1*

Složka hlavní směsi	4 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

* Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části [Nakládání s reagenty na straně 33](#).

- Pro zajištění homogenity 10krát pomalu odpipetujte a poté krátce odstřed'te. Hlavní směs ERA1 uchovávejte v chladu.
- Pro přípravu desky zvolte jednu z následujících možností:
 - Pokud jsou vzorky na desce MIDI, připravte je následujícím způsobem.
 - Změňte označení desky MIDI na LP2 (Příprava knihovny 2).
 - Pokud se některé vzorky nacházejí na samostatných deskách MIDI, přesuňte všechny vzorky do samostatných jamek na stejné MIDI desce na základě rozložení desky.

- Pokud je deska zmrazená, připravte ji následujícím způsobem.
 - a. Rozmrazte desku PCF PCR nebo LP PCR na pokojovou teplotu.
 - b. Odstředějte desku při 280 g po dobu 1 minuty.
 - c. Pipetováním 10krát promíchejte.
 - d. Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako LP2 (Příprava knihovny 2).
 - e. Přeneste všech 50 µl každého vzorku z desky PCF PCR nebo LP PCR do odpovídající jamky na desce LP2 MIDI.
 - f. Zlikvidujte desku PCF PCR nebo LP PCR.

Postup

1. Přidejte 10 µl hlavní směsi ERA1 do každé vzorkové jamky na desce LP2 MIDI.
2. Zlikvidujte zbývající hlavní směs ERA1.
3. Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
4. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
5. Inkubujte v předehřátém mikrovzorkovém inkubátoru při teplotě 30 °C po dobu 30 minut.
6. Ihned přeneste na druhý předehřátý mikrovzorkový inkubátor.
7. Inkubujte při 72 °C po dobu 20 minut.
8. Desku LP2 MIDI udržujte 5 minut v chladu.

Ligace adaptérů

Tento proces liguje adaptéry na konce fragmentů cDNA nebo gDNA.

Rozbor TSO Comprehensive (EU) obsahuje adaptéry SUA1 a UMI.

- Adaptéry SUA1 používejte se vzorky RNA.
- Adaptéry UMI používejte se vzorky DNA.

Příprava

1. Připravte následující reagenty.
 - ALB1 – Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředěte.
 - LIG3 – Krátce odstředěte a pipetováním promíchejte. Uchovávejte v chladu.
 - SUA1 – Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředěte.
 - UMI – Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředěte.
 - STL – Odložte pro účely postupu.

Postup

- Odeberte desku LP2 MIDI z ledu nebo obdobného materiálu.
- Přidejte 60 µl ALB1 do každé jamky vzorku na desce LP2 MIDI. ALB1 je viskózní roztok. Pipetujte pomalu, aby se minimalizovala tvorba bublin.
- Přidejte 5 µl LIG3 do každé jamky vzorku.
- Přidejte adaptéry následujícím způsobem.
Nekombinujte různé typy adaptérů.
 - [Jamky vzorku RNA]** – Přidejte 10 µl SUA1 (modré víčko) do každého vzorku odvozeného z RNA.
 - [Jamky vzorku DNA]** – Přidejte 10 µl UMI (bílé víčko) do každého vzorku odvozeného z DNA.
- Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
- Inkubujte 30 minut při pokojové teplotě.
- Promíchejte STL ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
- Přidejte 5 µl STL do každé jamky vzorku na desce LP2 MIDI.
- Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.

Čištění ligace

Tento proces používá SPB k čištění adaptérově ligovaných fragmentů cDNA nebo gDNA a odstraňuje nežádoucí produkty. Částice se dvakrát promyjí v čerstvém 80% ethanolu. Adaptérově ligované vzorky jsou eluovány s RSB.

Příprava

- Připravte následující reagenty.
 - SPB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - RSB – Odložte pro účely postupu.
- Připravte čerstvý 80% EtOH do 15ml nebo 50ml kónické zkumavky.

Tabulka 22 Připravte čerstvý 80% ethanol

Reagencie	4 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
100% ethanol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Voda prostá	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml
RNáz/DNáz					

- Promíchejte čerstvý 80% ethanol ve vortexové třepačce.

4. Připravte magnet.

Postup

Vazba

1. Míchejte SPB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.
2. Ihned přidejte 112 µl SPB do každé jamky vzorku na desce LP2 MIDI.
Pokud k dávkování SPB používáte žlab, započítejte při dávkování dostatečného množství materiálu na každý vzorek faktor přebytku 1,15. Po přidání SPB do každé jamky pro vzorek zlikvidujte veškerý zbývající materiál.
3. Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
4. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
5. Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
6. Umístěte desku LP2 MIDI na magnetický stojan na dobu 10 minut.
7. Aniž byste narušili shluk částic, pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z jednotlivých vzorkových jamek veškerý supernatant.

Mytí

1. Promyjte částice následujícím způsobem.
 - a. Ponechte desku LP2 MIDI na magnetickém stojanu a přidejte do každé vzorkové jamky 200 µl čerstvého 80% ethanolu.
 - b. Počkejte 30 sekund.
 - c. Aniž byste narušili shluk částic, pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z jednotlivých vzorkových jamek veškerý supernatant.
2. Promyjte částice **podruhé**.
3. Pipetou s jemnou špičkou odstraňte z každé jamky zbytky ethanolu.
4. Zlikvidujte nepoužitý 80% ethanol.

Eluování

1. Odeberte desku LP2 MIDI z magnetického stojanu.
2. Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
3. Přidejte 27,5 µl RSB do každé vzorkové jamky.
4. Na desku LP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
5. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
6. Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.

- Umístěte desku LP2 MIDI na magnetický stojan na dobu 2 minut.
- Označte novou 96jamkovou desku PCR jako LS (Vzorky knihovny).
- Přeneste 25 µl každého eluátu z desky LP2 MIDI do odpovídající jamky na desce LS PCR.
- Zlikvidujte prázdnou desku LP2 MIDI.

Indexace PCR

V tomto kroku jsou fragmenty knihovny amplifikovány pomocí primerů, které za účelem multiplexování vzorků přidávají sekvence indexů. Výsledný produkt obsahuje kompletní knihovnu fragmentů cDNA a/nebo DNA lemovaných adaptéry, které jsou potřebné pro generování klastru.

Příprava

- Připravte následující reagenty.
 - EPM – uchovávejte v chladu.
 - UPxx – Promíchejte ve vortexové třepačce a krátce odstřed'te. UPxx je indexační primer vybraný na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) v softwaru Local Run Manager při nastavení běhu.
 - CPxx – Promíchejte ve vortexové třepačce a krátce odstřed'te. CPxx je indexační primer vybraný na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) v softwaru Local Run Manager při nastavení běhu.
- Zajistěte, aby indexy jednotlivých vzorků odpovídaly běhu, který jste si během nastavení běhu naplánovali zde: Analytický modul TSO Comprehensive (EU). Při výběru indexu dodržujte pokyny uvedené v části [Počet knihoven a výběr indexů na straně 35](#).



UPOZORNĚNÍ

Rozdíly mezi vzorky a indexačními primery způsobí, že se z důvodu špatné identifikace pozitivních vzorků vykážou nesprávné výsledky.

Postup

- Přidejte 5 µl příslušného indexačního primeru (UPxx nebo CPxx) do odpovídající jamky vzorku na desce LS PCR v souladu s vybranými indexy.



UPOZORNĚNÍ

V jednu chvíli mějte otevřenou pouze jednu zkumavku s indexačním primerem a pracujte pouze s ní. Indexační zkumavku po použití ihned znovu uzavřete novým víčkem. Indexační primery nekombinujte dohromady.

- Míchejte EPM 5 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
- Přidejte 20 µl EPM do každé vzorkové jamky.
- Na desku LS PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.

5. Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 1 minuty.
6. Opět uskladněte reagenty před amplifikací.



UPOZORNĚNÍ

Proved'te všechny následné kroky v postamplifikační oblasti, abyste zabránili přenosu amplifikačního produktu.

7. Odstřed'ujte desku LS PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
8. Umístěte ji na předem naprogramovaný postamplifikační termocyklér a spusťte program I-PCR.
Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
V návaznosti na [Nastavení první hybridizace na straně 57](#) postupujte dle pokynů k rozmrazování reagentů v části Příprava na kroky protokolu.
9. Po dokončení programu I-PCR odstřed'ujte desku LS PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
10. Změňte označení desky na ALS (Vzorky z amplifikovaných knihoven).

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, uskladněte desku ALS PCR při teplotě od -25 °C do -15 °C až 30 dní.

Příprava na protokol

Tento přípravek je nutný k provedení kroků protokolu vedoucích k hybridizaci přes noc.

1. Zkontrolujte, že jsou nastaveny programy termocykléru po amplifikaci. Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
2. Vyjměte z krabice zkumavky s reagensií a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 23 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
TCB1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Nastavení první hybridizace

Tabulka 24 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
TCA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení první hybridizace

Tabulka 25 Krabice sady obsahu TruSight Oncology Comp (PN 20031122)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
OPR1 (červené víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení první hybridizace
OPD2 (bílé víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení první hybridizace

Nastavení první hybridizace

Během tohoto procesu se hybridizuje oligo fond do knihoven cDNA a oligo fond do knihoven gDNA připravených v kroku [Indexace PCR na straně 55](#). Obohacení cílených regionů vyžaduje dva kroky hybridizace. V první hybridizaci se oligo hybridizují do knihoven cDNA nebo gDNA přes noc (8 hodin až 24 hodin).

Příprava

1. Připravte následující reagensie.
 - TCB1 – Zahřívejte zkumavku při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - TCA1 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - OPR1 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - OPD2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
2. Pokud byla deska ALS PCR skladována, rozmrazte ji na pokojovou teplotu a odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty. Promíchejte použitím pipety.

3. Označte novou 96jamkovou desku PCR jako HYB1 (Hybridizace 1).

Postup

1. Přeneste 20 µl každé knihovny cDNA nebo gDNA z desky ALS PCR do odpovídající jamky na desce HYB1 PCR.
2. Na desku ALS PCR přilepte těsnění a odložte ji.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
3. Zkontrolujte, že se v TCB1 nenacházejí sraženiny. Pokud jsou přítomny, zahřejte zkumavku znovu a promíchejte ji ve vortexové třepačce, dokud se krystaly nerozpustí.
4. Přidejte 15 µl TCB1 do každé jamky knihovny na desce HYB1 PCR.
5. Přidejte 10 µl TCA1 do každé jamky knihovny na desce HYB1 PCR.
6. Přidejte sondy.
Nekombinujte různé typy sond. Do každé jamky přidejte pouze jednu sadu sond.
 - **[Jamky knihovny RNA]** – Přidejte 5 µl OPR1 (červené víčko) do každé knihovny odvozené z RNA.
 - **[Jamky knihovny DNA]** – Přidejte 5 µl OPD2 (bílé víčko) do každé knihovny odvozené z DNA.
7. Na desku HYB1 PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
8. Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 2 minut.
9. Vložte na termocyklér a spusťte program HYB1.
Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
10. Hybridizujte při 57 °C po dobu minimálně 8 hodin a maximálně 24 hodin.
11. Opět uskladněte hybridizační reagentie.
12. Desku ALS PCR skladujte při teplotě od –25 °C do –15 °C po dobu až 30 dní.

Příprava na protokol

Tato příprava je nutná k provedení kroků protokolu vedoucích k dalšímu bodu bezpečného přerušení.

Na začátku 2. dne vyjměte z krabice zkumavky s reagentiemi a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 26 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
SMB (tmavě modrý štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	První zachycení cílů Druhé zachycení cílů
ET2	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	První zachycení cílů Druhé zachycení cílů

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
HP3	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	První zachycení cílů Druhé zachycení cílů Normalizace knihoven
TCB1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Nastavení druhé hybridizace
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Druhé zachycení cílů Čištění amplifikované obohacené knihovny

Tabulka 27 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
EE2	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	První zachycení cílů Druhé zachycení cílů Normalizace knihoven
EEW	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	První zachycení cílů
TCA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení druhé hybridizace

Tabulka 28 Krabice sady obsahu TruSight Oncology Comp (PN 20031122)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
OPR1 (červené víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení druhé hybridizace
OPD2 (bílé víčko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Nastavení druhé hybridizace

První zachycení cílů

Tento krok používá SMB k zachycení sond hybridizovaných na cílené oblasti zájmu. Částice se promývají třikrát pomocí EEW. Obohacené knihovny jsou eluovány pomocí čerstvé eluční směsi EE2 + HP3 a neutralizovány pomocí ET2.

Příprava

1. Předehřejte mikrovzorkový inkubátor s vyhřívací vložkou MIDI na 57 °C.
2. Připravte následující reagencie.
 - EEW – Míchejte ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty.
 - EE2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředěte.
 - HP3 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředěte.

- SMB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Ujistěte se, že pro tento postup používáte **SMB**, nikoliv SPB.
 - ET2 – Odložte pro účely postupu.
3. Připravte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve zkumavce mikroadstředivky.

Tabulka 29 Eluční směs EE2 + HP3 pro první zachycení cílů*

Složka eluční směsi	4 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části [Nakládání s reagensy na straně 33](#).

4. Promíchejte eluční směs EE2 + HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te. Odložte stranou pro účely kroku [Eluování na straně 61](#).
5. Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako CAP1 (Zachycení 1).
6. Připravte magnet.

Postup

Vazba

1. Odeberte desku HYB1 PCR z termocykléru.
2. Odstřed'ujte desku HYB1 PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
3. Míchejte SMB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic. Pokud je přítomen precipitát nebo peleta částic, ujistěte se, že bylo dosaženo pokojové teploty, pipetujte nahoru a dolů, aby se peleta uvolnila, a poté promíchejte ve vortexové třepačce, aby se resuspendovala.
4. Ihned přidejte 150 µl SMB do každé jamky knihovny na desce CAP1 MIDI. Pokud k dávkování SMB používáte žlab, započítejte při alikvotaci průměrný faktor 1,15, abyste měli dostatek materiálu na vzorek.
5. Po přidání SMB do každé jamky pro vzorek zlikvidujte veškerý zbývající materiál.
6. Nastavte pipetu na 50 µl a přeneste celý objem každé knihovny z desky HYB1 PCR do odpovídající jamky na desce CAP1 MIDI.
7. Zlikvidujte prázdnou desku HYB1 PCR.
8. Na desku CAP1 MIDI přilepte těsnění. Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
9. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
10. Inkubujte v předehřátém mikrovzorkovém inkubátoru při teplotě 57 °C po dobu 25 minut.
11. Umístěte desku CAP1 MIDI na magnetický stojan na dobu 2 minut.
12. Desku z magnetického stojanu neodobírejte. Pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z každé jamky veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.

**UPOZORNĚNÍ**

Přejděte ihned k dalšímu kroku ([Mytí na straně 61](#)). Shluk částic se nesmí odstavit na delší dobu, pokud není přítomna kapalina.

Mytí

1. Promyjte částice následujícím způsobem.
 - a. Odeberte desku CAP1 MIDI z magnetického stojanu.
 - b. Přidejte 200 µl EEW do každé jamky.
 - c. Použijte pipetu nastavenou na 150 µl a pipetováním minimálně 10krát promíchejte. Zajistěte resuspendaci všech částic.

Pečlivým nasátím celého roztoku částic z jamek do špičky zajistěte, aby nebyly přítomny žádné shluky částic. Vizuálně zkontrolujte dno každé jamky. Pokud se v jamce nachází shluk částic, během kroků mytí naklánějte špičku pipety ke shluku částic, aby se shluk uvolnil. Zajistěte, aby byl celý shluk částic plně ponoren do roztoku. Roztok by měl mít tmavě hnědou barvu a homogenní konzistenci.
 - d. Na desku CAP1 MIDI přilepte těsnění.
 - e. Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
 - f. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 4 minut.
 - g. Inkubujte v mikrovzorkovém inkubátoru při teplotě 57 °C po dobu 5 minut.
 - h. Umístěte desku CAP1 MIDI na magnetický stojan na dobu 2 minut.
 - i. Desku z magnetického stojanu neodobírejte. Pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z každé jamky veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
2. Promyjte částice **podruhé**.
3. Promyjte částice **potřetí**.
4. Pipetou s jemnou špičkou odstraňte z každé jamky zbytky EEW.

Eluování

1. Odeberte desku CAP1 MIDI z magnetického stojanu.
2. Promíchejte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
3. Opatrně přidejte 17 µl eluční směsi EE2 + HP3 do každé jamky knihovny na desce CAP1 MIDI.
4. Zlikvidujte zbývající eluční směs EE2 + HP3.
5. Na desku CAP1 MIDI přilepte těsnění.

Důkladně utěsněte okraje a jamky.
6. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
7. Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
8. Označte novou 96jamkovou desku PCR jako ELU1 (Eluce 1).
9. Promíchejte ET2 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.

10. Přidejte 5 µl ET2 do každé odpovídající jamky knihovny na desce ELU1 PCR.
11. Opatrně přeneste 15 µl eluátu z jednotlivých jamek knihovny na desce CAP1 MIDI do odpovídajících jamek na desce ELU1 PCR.
12. Zlikvidujte prázdnou desku CAP1 MIDI.
13. Na desku ELU1 PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
14. Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 2 minut.
15. Opět uskladněte EEW.

Nastavení druhé hybridizace

V tomto kroku probíhá podruhé vazba cílových oblastí obohacených knihoven cDNA nebo gDNA se zachycovacími sondami. Druhá hybridizace zajišťuje vysokou specifitu zachycených oblastí. Pro zajištění optimálního obohacení knihoven provádějte krok druhé hybridizace při teplotě 57 °C po dobu minimálně 1,5 hodiny a maximálně 4 hodin.

Příprava

1. Připravte následující reagenty.
 - TCB1 – Zahřívejte zkumavku při teplotě 37 °C po dobu 5 minut. Míchejte 10 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - TCA1 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - OPR1 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - OPD2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.

Postup

1. Zkontrolujte, že se v TCB1 nenacházejí sraženiny. Pokud jsou přítomny, zahřejte zkumavku znovu a promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se krystaly nerozpustí.
2. Přidejte 15 µl TCB1 do každé jamky knihovny na desce ELU1 PCR.
3. Přidejte 10 µl TCA1 do každé jamky knihovny.
4. Do každé jamky přidejte stejnou sondu, která byla použita během první hybridizace. Do každé jamky přidejte pouze jednu sadu sond.
Nekombinujte různé typy sond.
 - **[Jamky knihovny RNA]** – Přidejte 5 µl OPR1 (červené víčko) do každé knihovny odvozené z RNA.
 - **[Jamky knihovny DNA]** – Přidejte 5 µl OPD2 (bílé víčko) do každé knihovny odvozené z DNA.
5. Na desku ELU1 PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
6. Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 2 minut.

- Vložte na termocyklér a spusťte program HYB2.
Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
- Hybridizujte při 57 °C po dobu minimálně 1,5 hodiny a maximálně 4 hodin.
- Opět uskladněte hybridizační reagenty.

Druhé zachycení cílů

Tento krok používá SMB k zachycení sond hybridizovaných na cílené oblasti zájmu. Částice se jednou promyjí v RSB. Obohacené knihovny jsou eluovány pomocí čerstvé eluční směsi EE2 + HP3 a neutralizovány pomocí ET2.

Příprava

- Předehřejte mikrovzorkový inkubátor s vyhřívací vložkou MIDI na 57 °C.
- Připravte následující reagenty.
 - EE2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - HP3 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - SMB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
Ujistěte se, že pro tento postup používáte **SMB**, nikoliv SPB.
 - RSB – Odložte pro účely postupu.
 - ET2 – Odložte pro účely postupu.
- Připravte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve zkumavce mikroadstředivky.

Tabulka 30 Eluční směs EE2 + HP3 pro druhé zachycení cílů*

Složka eluční směsi	4 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části [Nakládání s reagenty na straně 33](#).

- Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te. Odložte pro účely kroku [Eluování na straně 64](#).
- Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako CAP2 (Zachycení 2).
- Připravte magnet.

Postup

Vazba

- Odeberte desku ELU1 PCR z termocykléru.
- Odstřed'ujte desku ELU1 PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
- Míchejte SMB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.

Pokud je přítomen precipitát nebo peleta částic, ujistěte se, že bylo dosaženo pokojové teploty, pipetujte nahoru a dolů, aby se peleta uvolnila, a poté promíchejte ve vortexové třepačce, aby se resuspendovala.

4. Ihned přidejte 150 µl SMB do každé jamky knihovny na desce CAP2 MIDI.
Pokud k dávkování SMB používáte žlab, započítejte při alikvotaci průměrný faktor 1,15, abyste měli dostatek materiálu na vzorek.
5. Po přidání SMB do každé jamky pro vzorek zlikvidujte veškerý zbývajících materiál.
6. Nastavte pipetu na 50 µl a přeneste celý objem každé knihovny z desky ELU1 PCR do odpovídající jamky na desce CAP2 MIDI.
7. Zlikvidujte prázdnou desku ELU1 PCR.
8. Na desku CAP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
9. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
10. Inkubujte v mikrovzorkovém inkubátoru při teplotě 57 °C po dobu 25 minut.
Pokud pokračujete krokem [Amplifikace obohacené knihovny na straně 67](#), postupujte dle pokynů k rozmrazování reagentů v části [Příprava na protokol](#).
11. Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
12. Desku CAP2 MIDI z magnetického stojanu neodebírejte. Pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z každé jamky veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.



UPOZORNĚNÍ

Přejděte ihned k dalšímu kroku ([Mytí na straně 64](#)). Shluk částic se nesmí odstavit na delší dobu, pokud není přítomna kapalina.

Mytí

1. Odeberte desku CAP2 MIDI z magnetického stojanu.
2. Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
3. Přidejte 200 µl RSB do každé jamky.
4. Na desku CAP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
5. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 4 minut.
6. Umístěte desku na magnetický stojan na dobu 2 minut.
7. Desku z magnetického stojanu neodobírejte. Pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z každé jamky veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
8. Pipetou s jemnou špičkou odstraňte z každé jamky zbytky RSB.

Eluování

1. Odeberte desku CAP2 MIDI z magnetického stojanu.

- Promíchejte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
- Přidejte 22 µl eluční směsi EE2 + HP3 do každé jamky knihovny na desce CAP2 MIDI.
- Zlikvidujte zbývající eluční směs EE2 + HP3.
- Na desku CAP2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
- Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
- Označte novou 96jamkovou desku PCR jako ELU2 (Eluce 2).
- Promíchejte ET2 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
- Přidejte 5 µl ET2 do každé odpovídající jamky knihovny na desce ELU2 PCR.
- Opatrně přeneste 20 µl eluátu z jednotlivých jamek knihovny na desce CAP2 MIDI do odpovídajících jamek na desce ELU2 PCR.
- Zlikvidujte prázdnou desku CAP2 MIDI.
- Na desku ELU2 PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
- Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 2 minut.
- Opět uskladněte SMB, EE2, HP3 RSB a ET2.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, odstřed'ujte desku ELU2 PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C až 7 dní.

Příprava na protokol

Tato příprava je nutná k provedení kroků protokolu vedoucích k dalšímu bodu bezpečného přerušení.

- Připravte kbelík na led nebo ekvivalent.
- Vyjměte z krabice zkumavky s reagensií a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 31 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
PPC3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Amplifikace obohacené knihovny
EPM	-25 °C až -15 °C	Uchovávejte v chladu.	Amplifikace obohacené knihovny

Tabulka 32 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
SPB (světle zelený štítek)	2 °C až 8 °C	Přived'te k pokojové teplotě na 30 minut.	Čištění amplifikované obohacené knihovny
RSB	2 °C až 8 °C	Přived'te k pokojové teplotě.	Čištění amplifikované obohacené knihovny Příprava na sekvenování

Amplifikace obohacené knihovny

Tento krok používá primery k amplifikaci obohacených knihoven.

Příprava

1. Pokud byla deska ELU2 skladována, rozmrazte ji na pokojovou teplotu a následně odstředíte při 280 g po dobu 1 minuty.

Postup

1. Promíchejte PPC3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstředíte.
2. Přidejte 5 µl PPC3 do každé jamky knihovny na desce ELU2 PCR.
3. Míchejte EPM 5 sekund ve vortexové třepačce a poté krátce odstředíte.
4. Přidejte 20 µl EPM do každé jamky knihovny.
5. Na desku ELU2 PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
6. Míchejte v třepačce při 1 200 ot./min po dobu 2 minut.
7. Vložte na termocyklér a spusťte program EL-PCR.
Viz část [Programování termocyklérů na straně 41](#).
Pokud pokračujete krokem [Normalizace knihoven na straně 70](#), postupujte dle pokynů k rozmrazování v části [Příprava na protokol](#).
8. Opět uskladněte PPC3 a EPM.

Čištění amplifikované obohacené knihovny

Tento proces používá SPB k vyčištění obohacených knihoven od nežádoucích reakčních složek. Částice se dvakrát promyjí v čerstvém 80% ethanolu. Knihovny jsou eluovány pomocí RSB.

Příprava

1. Připravte následující reagenty.
 - SPB – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Ujistěte se, že pro tento postup používáte **SPB**, nikoliv **SMB**.
 - RSB – Odložte pro účely postupu.
2. Připravte čerstvý 80% ethanol do 15ml nebo 50ml kónické zkumavky.

Tabulka 33 Přípravte čerstvý 80% ethanol

Reagencie	4 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
100% ethanol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Voda prostá RNáz/DNáz	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Promíchejte čerstvý 80% ethanol ve vortexové třepačce.
- Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako BIND2 (Čisticí vazba).
- Přípravte magnet.

Postup

Vazba

- Odeberte desku ELU2 PCR z termocykléru.
- Odstřed'ujte desku ELU2 PCR při 280 g po dobu 1 minuty.
- Míchejte SPB ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic.
- Ihned přidejte 110 µl SPB do každé jamky knihovny na desce BIND2 MIDI.
- Přeneste 50 µl z každé knihovny z desky ELU2 PCR do odpovídající jamky na desce BIND2 MIDI.
- Zlikvidujte prázdnou desku ELU2 PCR.
- Na desku BIND2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
- Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
- Umístěte desku BIND2 MIDI na magnetický stojan na dobu 5 minut.
- Desku z magnetického stojanu neodobírejte. Pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z každé jamky veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.

Mytí

- Promyjte částice následujícím způsobem.
 - Ponechte desku BIND2 MIDI na magnetickém stojanu a přidejte do každé jamky 200 µl čerstvého 80% ethanolu.
 - Počkejte 30 sekund.
 - Pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z každé jamky veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
- Promyjte částice **podruhé**.
- Pipetou s jemnou špičkou odstraňte z každé jamky zbytky ethanolu.
- Zlikvidujte nepoužitý 80% ethanol.

Eluování

1. Odeberte desku BIND2 MIDI z magnetického stojanu.
2. Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
3. Přidejte 32 µl RSB do každé jamky knihovny.
4. Na desku BIND2 MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
5. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
6. Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
7. Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
8. Označte novou 96jamkovou desku PCR jako PL (Vyčištěné knihovny).
9. Přeneste 30 µl každého eluátu z desky BIND2 MIDI do odpovídající jamky na desce PL PCR.
10. Zlikvidujte prázdnou desku BIND2 MIDI.
11. Na desku PL PCR přilepte těsnění.
12. Opět uskladněte SPB a RSB.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, odstřed'ujte desku PL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C až 30 dní.

Příprava na protokol

Tato příprava je nutná k provedení kroků protokolu vedoucích k dalšímu bodu bezpečného přerušení.

1. Vyjměte z krabice zkumavky s reagenty a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 34 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
LNA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Normalizace knihoven
EE2	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu.	Normalizace knihoven

Tabulka 35 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
LNB1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě na 30 minut.	Normalizace knihoven
HP3	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Normalizace knihoven Příprava na sekvenování
LNW1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Normalizace knihoven

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
LNS1	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Normalizace knihoven

- Pokud stejný den pokračujete krokem [Příprava na sekvenování na straně 73](#), postupujte dle pokynů k rozmrazování v části [Příprava na protokol](#).

Normalizace knihoven

Tento proces používá LNB1 plus přísady (LNA1) k normalizaci množství každé knihovny, aby se tak zajistila jednotná reprezentace knihovny ve fondu knihoven. Částice se dvakrát promyjí v LNW1. Knihovny jsou eluovány čerstvou eluční směsí EE2 + HP3 a neutralizovány pomocí LNS1.

Příprava

- Připravte následující reagencie.
 - LNB1 – Zajistěte, aby byly částice ponechány při pokojové teplotě po dobu 30 minut.
 - LNA1 – Promíchejte ve vortexové třepačce.
 - EE2 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - HP3 – Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
 - LNW1 – Promíchejte ve vortexové třepačce. Odložte pro účely postupu.
 - LNS1 – Promíchejte ve vortexové třepačce. Odložte pro účely postupu.
- Míchejte LNB1 ve vortexové třepačce po dobu 1 minuty, dokud nedosáhnete resuspendace částic. Promíchejte LNB1 v překlopné třepačce, abyste zajistili resuspendaci částic.
- Pomocí pipety nastavené na 800 µl desetkrát nasajte a vypusťte LNB1, čímž zajistíte resuspendaci.
- Ihned připravte čerstvou hlavní směs LNA1 + LNB1 v kónické zkumavce.



UPOZORNĚNÍ

Proved'te úplnou resuspendaci shluku částic LNB1 v dolní části zkumavky, aby se zabránilo nekonzistentní hustotě klastru.

Tabulka 36 Hlavní směs LNA1 + LNB1*

Složka hlavní směsi	4 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
LNA1	305 µl	610 µl	1 219 µl	1 829 µl	3 658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části [Nakládání s reagensy na straně 33](#).

- Promíchejte hlavní směs LNA1 + LNB1 ve vortexové třepačce. Odložte stranou pro účely kroku [Vazba na straně 71](#).

6. Připravte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve zkumavce mikroodstředivky.

Tabulka 37 Eluční směs EE2 + HP3 k normalizaci knihoven*

Složka eluční směsi	4 knihovny	8 knihoven	16 knihoven	24 knihoven	48 knihoven
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1 824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Tato tabulka obsahuje objemové přebytky. Výpočty jsou uvedeny v části [Nakládání s reagensiemi na straně 33](#).

7. Promíchejte čerstvou eluční směs ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte. Odložte pro účely kroku [Eluování na straně 72](#).
8. Pokud byla deska PL PCR skladována, rozmrazte ji na pokojovou teplotu a odstředte při 280 g po dobu 1 minuty. Promíchejte použitím pipety.
9. Označte novou 96jamkovou desku MIDI jako BBN (Normalizace na základě částic).
10. Připravte magnet.

Postup

Vazba

- Promíchejte hlavní směs LNA1 + LNB1 ve vortexové třepačce.
- Ihned přidejte 45 µl hlavní směsi LNA1 + LNB1 do každé jamky knihovny na desce BBN MIDI.
- Zlikvidujte zbývající hlavní směs LNA1 + LNB1.
- Přidejte 20 µl z každé knihovny z desky PL PCR do odpovídající jamky na desce BBN MIDI.
- Na desku BBN MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
- Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 30 minut.
- Na desku PL PCR přilepte těsnění a opět ji uskladněte.
- Umístěte desku BBN MIDI na magnetický stojan na dobu 2 minut.
- Desku z magnetického stojanu neodebírejte. Pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z každé jamky veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.

Mytí

- Promyjte částice následujícím způsobem.
 - Odeberte desku BBN MIDI z magnetického stojanu.
 - Přidejte 45 µl LNW1 do každé jamky knihovny.
 - Na desku BBN MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
 - Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 5 minut.
 - Umístěte desku BBN MIDI na magnetický stojan na dobu 2 minut.

- f. Desku z magnetického stojanu neodobírejte. Pomocí pipety nastavené na 200 µl odeberte z každé jamky veškerý supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
2. Promyjte částice *podruhé*.
 3. Pipetou s jemnou špičkou odstraňte z každé jamky zbytky supernatantu.

Eluování

1. Odeberte desku BBN MIDI z magnetického stojanu.
2. Promíchejte čerstvou eluční směs EE2 + HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
3. Přidejte 32 µl roztoku EE2 + HP3 do každé jamky knihovny na desce BBN MIDI.
4. Zlikvidujte zbývající eluční směs.
5. Na desku BBN MIDI přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
6. Míchejte v třepačce při 1 800 ot./min po dobu 2 minut.
7. Umístěte na magnetický stojan na 2 minuty.
8. Označte novou 96jamkovou desku PCR jako NL (Normalizované knihovny).
9. Opatrně přeneste 30 µl eluátu z jednotlivých jamek knihovny na desce BBN MIDI do odpovídajících jamek na desce NL PCR.



UPOZORNĚNÍ

Pokud dojde k nasátí částic do pipetových špiček, vypusťte částice zpět na desku na magnetickém stojanu, a předtím, než budete pokračovat dalším krokem postupu, vyčkejte, dokud kapalina nebude čirá (cca 2 minuty).

10. Zlikvidujte prázdnou desku BBN MIDI.
11. Promíchejte LNS1 ve vortexové třepačce.
12. Přidejte 30 µl LNS1 do každé jamky knihovny na nové desce NL PCR.
13. Pipetováním pětkrát promíchejte.
14. Na desku NL PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
15. Opět uskladněte LNB1, LNA1, EE2, LNW1 a LNS1.

BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, odstřed'ujte desku NL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C až 32 dní.

Příprava na protokol

Tento přípravek je nutný k provedení kroků protokolu vedoucích k sekvenování.

S přípravou spotřebního materiálu pro sekvenování ze sady NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) (PN 20028871) začněte nejméně hodinu před použitím.

1. Vyjměte pufr pro ředění knihovny (HT1) skladovacích prostor o teplotě -25 °C až -15 °C. Rozmrazte na pokojovou teplotu. Po rozmrazení uchovávejte v chladu.
2. U ostatního spotřebního materiálu v sadě postupujte podle pokynů pro přípravu v *Referenční příručka pro NextSeq 550Dx Instrument (dokument č. 1000000009513)*.
 - Zásobník s reagensiemi NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů)
 - Zásobník s pufrem NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklů)
 - Zásobník s průtokovou kyvetou NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklů)
3. Vyjměte z krabice zkumavky s reagensií a postupujte dle pokynů k rozmrazení.

Tabulka 38 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (mrazení) (PN 20031121)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
PhiX Internal Control (PX3 nebo PhiX)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na pokojovou teplotu. Po rozmrazení uchovávejte v chladu.	Příprava na sekvenování

Tabulka 39 Krabice TruSight Oncology Comp Enrichment (chlazení) (PN 20031123)

Reagencie	Skladování	Pokyny k rozmrazování	Krok protokolu
HP3	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Příprava na sekvenování
RSB (růžový štítek)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě.	Příprava na sekvenování

Příprava na sekvenování

Každý běh sekvenování DNA a RNA by měl zahrnovat pozitivní kontrolu a NTC (kontrolu bez templátu). NTC pro DNA a RNA jsou sekvenovány opakovaně podle potřeby, aby každý běh obsahoval NTC. Každý běh DNA a RNA zahrnuje samostatnou pozitivní kontrolu.

Příprava

1. Seznamte se s pokyny v části [Počet knihoven a výběr indexů na straně 35](#).
2. Označte zkumavku mikroodstředivky jako dHP3 (zředěné HP3).
3. Označte zkumavku mikroodstředivky jako dPhiX (zředěné PhiX).
4. Předehřejte tepelný blok pro zkumavky mikroodstředivky na 96 °C.

5. Připravte kbelík na led nebo ekvivalent.

Kontrola ředění a denaturace PhiX

1. Promíchejte HP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
2. Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroadstředivky dHP3.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl vody prosté RNáz/DNáz
3. Promíchejte dHP3 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
4. Promíchejte RSB v překlopné nebo vortexové třepačce.
5. Promíchejte kontrolu PhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
6. Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroadstředivky dPhiX.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl kontroly Phix
7. Přidejte 10 µl dHP3 do zkumavky dPhiX.
8. Zlikvidujte zkumavku dHP3.
9. Promíchejte zkumavku dPhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
10. Inkubujte dPhiX 5 minut při pokojové teplotě kvůli denaturaci.
11. Promíchejte HT1 ve vortexové třepačce.
12. Ihned přidejte 980 µl předchlazeného HT1 do dPhiX.
13. Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
14. Uchovávejte dPhiX v chladu, dokud nebude použito v přípravě druhého ředění.
Cílová koncentrace je 20 pM dPhiX.
15. Znovu uskladněte PhiX, HP3 a RSB.

Vložení do fondu a denaturace knihoven pro TSO Comprehensive (EU)

1. Pokud byla deska NL PCR skladována, rozmrazte ji na pokojovou teplotu a následně odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
2. Pomocí sady vícekanálové pipety nastavené na 30 µl opatrně pětikrát pipetováním promíchejte knihovny na desce NL PCR.
Pro každou knihovnu použijte čerstvé špičky.



UPOZORNĚNÍ

Optimální výkon zajistíte řádným promícháním knihoven.

3. Pro vložení do fondu, denaturaci a ředění knihoven zvolte jednu z následujících možností.
 - **[Možnost č. 1]** Současná sekvenace knihoven odvozených ze vzorků RNA a vzorků DNA. Viz [1. možnost: Knihovny DNA a RNA společně na straně 75.](#)

- [Možnost č. 2] Sekvenace knihoven odvozených pouze ze vzorků DNA. Viz [2. možnost: Knihovny pouze DNA na straně 76](#).
- [Možnost č. 3] Sekvenace knihoven odvozených pouze ze vzorků RNA. Viz [3. možnost: Knihovny pouze RNA na straně 77](#)

1. možnost: Knihovny DNA a RNA společně

1. Označte zkumavku mikroadstředivky jako PRL (Knihovny RNA ve fondu).
2. Označte zkumavku mikroadstředivky jako PDL (Knihovny DNA ve fondu).
3. Přeneste 10 µl každé normalizované knihovny RNA (cDNA) z desky NL do zkumavky PRL. Nedávejte do fondu dvě knihovny se stejným indexačním primerem.
4. Přeneste 10 µl každé normalizované knihovny DNA z desky NL do zkumavky PDL. Nedávejte do fondu dvě knihovny se stejným indexačním primerem.
5. Na desku NL PCR přilepte těsnění. Důkladně utěsněte okraje a jamky.
6. Promíchejte zkumavky PRL a PDL ve vortexové třepačce.
7. Zkumavky PRL a PDL krátce odstřed'te.
8. Inkubujte zkumavky PRL a PDL na tepelném bloku při 96 °C po dobu 2 minut.
9. Zkumavky PRL a PDL uchovávejte chladné po dobu 5 minut.
10. Promíchejte PRL a PDL ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
11. Zkumavky PRL a PDL uchovávejte chladné.

Příprava prvního ředění

1. Označte zkumavku mikroadstředivky jako DIL1 (Ředění 1).
2. Přeneste 20 µl PDL do prázdné zkumavky DIL1.
3. Přidejte 5 µl PRL do zkumavky DIL1.
4. Zlikvidujte zkumavky PDL a PRL.
5. Přidejte 475 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL1 (ředění 1 : 20).
6. Promíchejte zkumavku DIL1 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.

Příprava druhého ředění

1. Označte 2,0ml zkumavku mikroadstředivky jako DIL2 (Ředění 2).
2. Přeneste 40 µl DIL1 do prázdné zkumavky DIL2.
3. Zlikvidujte zkumavku DIL1.
4. Přidejte 1 660 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL2 (ředění 1 : 850).
5. Promíchejte připravený 20pM dPhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.

6. Přidejte 2,5 µl připraveného 20pM dPhiX do zkumavky DIL2.
7. Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
8. Vložte 1 300 µl DIL2 do rozmrazeného zásobníku s reagenciemi NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů).
Další informace viz *Referenční příručka pro NextSeq 550Dx Instrument (dokument č. 1000000009513)*.
9. Zlikvidujte zkumavku DIL2.
10. Odstřed'ujte desku NL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a poté skladujte při teplotě od –25 °C do –15 °C až 32 dní.
11. Pokračujte v sekvenaci.
Další informace viz *Referenční příručka pro NextSeq 550Dx Instrument (dokument č. 1000000009513)*.

2. možnost: Knihovny pouze DNA

1. Označte zkumavku mikroodstředivky jako PDL (Knihovny DNA ve fondu).
2. Přeneste 10 µl z každé normalizované knihovny DNA z desky NL do zkumavky PDL.
Nedávejte do fondu dvě knihovny se stejným indexačním primerem.
3. Na desku NL PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky.
4. Promíchejte zkumavku PDL ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
5. Inkubujte zkumavku PDL na tepelném bloku při 96 °C po dobu 2 minut.
6. Uchovávejte zkumavku PDL chladnou po dobu 5 minut.
7. Promíchejte zkumavku PDL ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
8. Udržujte zkumavku PDL chladnou.

Příprava prvního ředění

1. Označte zkumavku mikroodstředivky jako DIL1 (Ředění 1).
2. Přeneste 10 µl PDL do prázdné zkumavky DIL1.
3. Zlikvidujte zkumavku PDL.
4. Přidejte 190 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL1 (ředění 1 : 20).
5. Promíchejte DIL1 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.

Příprava druhého ředění

1. Označte 2,0ml zkumavku mikroodstředivky jako DIL2 (Ředění 2).
2. Přeneste 40 µl DIL1 do prázdné zkumavky DIL2.
3. Zlikvidujte zkumavku DIL1.
4. Přidejte 1 660 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL2 (ředění 1 : 850).

5. Promíchejte připravený 20pM dPhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
6. Přidejte 2,5 µl připraveného 20pM dPhiX do zkumavky DIL2.
7. Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
8. Vložte 1 300 µl DIL2 do rozmrazeného zásobníku s reagenциemi NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů).
Další informace viz *Referenční příručka pro NextSeq 550Dx Instrument (dokument č. 1000000009513)*.
9. Zlikvidujte zkumavku DIL2.
10. Odstřed'ujte desku NL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a poté skladujte při teplotě od –25 °C do –15 °C až 32 dní.
11. Pokračujte v sekvenaci.
Další informace viz *Referenční příručka pro NextSeq 550Dx Instrument (dokument č. 1000000009513)*.

3. možnost: Knihovny pouze RNA

1. Označte zkumavku mikroodstředivky jako PRL (Knihovny RNA ve fondu).
2. Přeneste 10 µl z každé normalizované knihovny RNA (cDNA) z desky NL do zkumavky PRL.
Nedávejte do fondu dvě knihovny se stejným indexačním primerem.
3. Na desku NL PCR přilepte těsnění.
Důkladně utěsněte okraje a jamky, aby se zabránilo odpařování.
4. Promíchejte zkumavku PRL ve vortexové třepačce.
5. Zkumavku PRL krátce odstřed'te.
6. Inkubujte zkumavku PRL na tepelném bloku při 96 °C po dobu 2 minut.
7. Uchovávejte zkumavku PRL chladnou po dobu 5 minut.
8. Promíchejte zkumavku PRL ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
9. Udržujte zkumavku PRL chladnou.

Příprava prvního ředění

1. Označte zkumavku mikroodstředivky jako DIL1 (Ředění 1).
2. Přeneste 10 µl PRL do prázdné zkumavky DIL1.
3. Zlikvidujte zkumavku PRL.
4. Přidejte 190 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL1 (ředění 1 : 20).
5. Promíchejte DIL1 ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.

Příprava druhého ředění

1. Označte 2,0ml zkumavku mikroodstředivky jako DIL2 (Ředění 2).
2. Přeneste 40 µl DIL1 do prázdné zkumavky DIL2.

3. Zlikvidujte zkumavku DIL1.
4. Přidejte 1 646 µl předchlazeného HT1 do zkumavky DIL2 (ředění 1 : 843).
5. Promíchejte připravený 20pM dPhiX ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
6. Přidejte 16,7 µl připraveného 20pM dPhiX do zkumavky DIL2.
7. Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstřed'te.
8. Vložte 1 300 µl DIL2 do rozmrazeného zásobníku s reagensy NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů).
Další informace viz *Referenční příručka pro NextSeq 550Dx Instrument (dokument č. 1000000009513)*.
9. Zlikvidujte zkumavku DIL2.
10. Odstřed'ujte desku NL PCR při 280 g po dobu 1 minuty a skladujte při teplotě od –25 °C do –15 °C až 32 dní.
11. Pokračujte v sekvenaci.
Další informace viz *Referenční příručka pro NextSeq 550Dx Instrument (dokument č. 1000000009513)*.

Interpretace výsledků

Výsledky sekvenování z rozboru TSO Comprehensive (EU) se vykazují pro každý vzorek samostatně ve výkazu ve formátu PDF a výkazu ve formátu JSON. Na úrovni vzorků se generuje i výkaz malé hloubky (`LowDepthReport.tsv`).

Na úrovni běhu jsou generovány následující výstupní soubory:

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

Ve výkazech PDF a JSON se zobrazí pouze ty varianty, které úspěšně projdou kontrolou kvality.

Podrobné informace o analýze viz *Průvodce pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661)*.

Výsledky doprovodné diagnostiky

U každého zamýšleného použití doprovodné diagnostiky (CDx) existují tři možné výsledky:

- **Pozitivní** – Byla zjištěna varianta nebo biomarker s klasifikací na úrovni 1 (CDx).
- **Nezjištěno** – Ve vzorku nejsou zjištěny žádné varianty ani biomarkery související se zamýšleným použitím CDx. Typ nádoru vybraný pro vzorek odpovídá danému CDx.
- **Žádný výsledek** – Určení stavu varianty není možné, protože nastal alespoň jeden z následujících důvodů:
 - Zamýšlené použití CDx nebylo použitelné pro testovaný vzorek, protože typ nádoru vybraný pro vzorek neodpovídá typu nádoru CDx.
 - Běh sekvenování nevyhověl specifikacím kontroly kvality.
 - Knihovna nevyhověla specifikacím požadované kontroly kvality.
 - Příslušná nukleová kyselina neproběhla.

Veškeré výsledky zamýšleného použití CDx se vykazují v části Companion Diagnostic Results (Výsledky doprovodné diagnostiky) výkazu JSON. V části Companion Diagnostic Results (Výsledky doprovodné diagnostiky) ve výkazu PDF se uvádějí pouze ta zamýšlená použití, která mají pozitivní výsledek.

Varianty profilování nádorů

TSO Comprehensive (EU) je určen k vykazování somatických variant při vykazování variant s prokázanou klinickou významností nebo variant s potenciální klinickou významností. Software rozboru TSO Comprehensive (EU) používá znalostní bázi, která určuje, zda má každá zjištěná a způsobilá varianta ([Tabulka 2](#)) prokázanou klinickou významnost nebo potenciální klinickou významnost na základě poznatků o terapeutických, diagnostických nebo prognostických asociacích. Znalostní báze rovněž zohledňuje, zda jsou (nebo nejsou) u testovaného typu nádoru prokázány asociace. Náchylnost nebo rizikové faktory nádorů nejsou ve znalostní bázi zahrnuty. Běžné polymorfismy jsou odstraněny.

U variant profilování nádorů se pozitivní výsledky v souladu se znalostní bází a identifikovaným typem nádoru klasifikují jako genomové nálezy s důkazy o klinické významnosti (úroveň 2) nebo genomové nálezy s potenciální klinickou významností (úroveň 3).

Selhání kontroly kvality mají za následek, že pro typy variant relevantní pro neúspěšnou metriku kontroly kvality nejsou získány žádné výsledky. Další informace naleznete v [Tabulka 40](#) a [Tabulka 41](#). Pozice profilování nádorů s nedostatečnou hloubkou se uvádějí ve výkazu Výkaz malé hloubky, nikoli ve výkazu TSO Comprehensive (EU).

Kontrola kvality

- Informace o kvantifikaci nukleové kyseliny a minimální požadavky na vstupní materiál naleznete v části [Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27](#).
- Běh sekvenování a platnost vzorku se stanovují automaticky a k jejich vykazování se používá Analytický modul TSO Comprehensive (EU). Podrobné informace o analýze viz *Průvodce pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661).
- Výsledky kontroly kvality jsou shrnuty ve výkazu TSO Comprehensive (EU), který je k dispozici ve formátech PDF a JSON. Soubory výkazů se nacházejí ve složce analýzy. Umístění složky analýzy (obsahuje zprávy PDF a JSON) a složky spuštění naleznete v části *Průvodce pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661).

Tabulka 40 Metriky kontroly kvality pro výsledky výkazu TSO Comprehensive (EU)

Typ výstupu	Metrika	Specifikace	Popis	Dopad chybné specifikace*
Běh sekvenování	PCT_PF_READS (%)	$\geq 80,0$	Procento čtení, která prošla filtrem (PF).	Běh sekvenování je neplatný. Pro žádný vzorek v běhu nebyly hlášeny výsledky.
	PCT_Q30_R1 (%)	$\geq 80,0$	Průměrné procento přiřazení báze se skóre kvality Q30 nebo vyšším pro Čtení 1.	Běh sekvenování je neplatný. Pro žádný vzorek v běhu nebyly hlášeny výsledky.
	PCT_Q30_R2 (%)	$\geq 80,0$	Průměrné procento přiřazení báze se skóre kvality Q30 nebo vyšším pro Čtení 2.	
Knihovny DNA	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 NEBO > 3106 a P-HODNOTOU $\leq 0,049$	Metrika hodnotící pravděpodobnost kontaminace pomocí VAF (frekvence variantní alely) u běžných variant. Skóre kontaminace na základě rozdělení VAF SNP. Hodnota P kontaminace použita k vyhodnocení vysoce přestavěných genomů. Používá se pouze tehdy, když je skóre kontaminace vyšší než horní mez specifikace.	Nejsou vykázány žádné výsledky DNA.

Typ výstupu	Metrika	Specifikace	Popis	Dopad chybné specifikace*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Mediánová délka fragmentu ve vzorku.	Nejsou vykázány žádné
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (počet)	≥ 150	Mediánové pokrytí fragmentů exonů ve všech bázích exonů.	výsledky TMB nebo malých variant DNA.
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Procento bází exonů s pokrytím fragmentů 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (počet)	≥ 40	Počet míst MSI použitelných pro přiřazení MSI (počet mikrosatelitových míst s dostatečným rozsahem čtení pro identifikaci mikrosatelitové nestability).	Nejsou vykázány žádné výsledky MSI.
	COVERAGE_MAD (počet)	$\leq 0,210$	Medián absolutních odchylek od mediánu normalizovaného počtu v jednotlivých cílových oblastech CNV.	Nejsou vykázány žádné výsledky
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (počet)	$\geq 1,0$	Mediánový počet souborů raw bin na jeden cíl CNV.	genové amplifikace.
Knihovny RNA	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Mediánová délka fragmentu ve vzorku.	Nejsou vykázány žádné výsledky fúzí ani splice variant.

Typ výstupu	Metrika	Specifikace	Popis	Dopad chybné specifikace*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeficient)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X je míra jednotnosti pokrytí. Pro každý gen s pokrytím alespoň 500X se vypočítá variační koeficient pokrytí na celém těle genu. Tato metrika představuje medián těchto hodnot. Vysoká hodnota znamená vysokou úroveň variace a poukazuje na problém při přípravě knihovny, například na malý počet vzorků nebo na problémy s odpadáváním sondy. Tato metrika se počítá pomocí všech čtení (včetně čtení označených jako duplicitní).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (počet)	$\geq 9\,000\,000$	Celkový počet čtení, která se mapují na cílové oblasti. Tato metrika se počítá pomocí všech čtení (včetně čtení označených jako duplicitní).	

* Úspěšné výsledky jsou označeny jako PASS (ÚSPĚCH).

Tabulka 41 Metriky kontroly pro výsledky výkazu TSO Comprehensive (EU)

Typ výstupu	Metrika	Specifikace	Dopad chybné specifikace*
Pozitivní kontrola	Externí kontrola DNA	Zjištěno 23 z 24 specifikovaných variant	Na základě výsledků kontrolního vzorku ručně zneplatněte vzorky pacienta. Software analytického modulu neprovádí automatické zneplatnění patientských vzorků na základě výsledků kontrolního vzorku.
	Externí kontrola RNA	Zjištěno 12 ze 13 specifikovaných variant	
Kontrola bez templátu	Medián pokrytí exonu DNA pro TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Na základě výsledků kontrolního vzorku ručně zneplatněte vzorky pacienta. Software analytického modulu neprovádí automatické zneplatnění patientských vzorků na základě výsledků kontrolního vzorku.
	Mezní hodnota nad mediánem genu RNA	≤ 1	

* Úspěšné výsledky jsou označeny jako PASS (ÚSPĚCH).

- Zopakujte běhy sekvenování, které jsou neplatné.
- Testy zopakujte u knihoven, které mají následující výsledky:
 - Kontaminované knihovny DNA
 - Neplatné knihovny RNA
 - Testy lze opakovat za účelem získání více variant nebo výsledků biomarkerů u knihoven DNA, které byly zneplatněny kvůli jednomu, ale ne všem typům variant.
- U přiřazení variant se vyhodnocují pozitivní kontroly. Pokud pozitivní kontroly nesplňují specifikace přiřazení variant, ručně zneplatněte běh sekvenování. Software analytického modulu neprovádí automatické zneplatnění patientských vzorků na základě výsledků kontrolního vzorku.
- Kontroly NTC se vyhodnocují s ohledem na medián pokrytí exonu pro DNA a mezní hodnotu nad mediánem genu pro RNA. Pokud negativní kontroly neodpovídají specifikacím, ručně zneplatněte událost přípravy knihovny a všechny související běhy sekvenování. Software analytického modulu neprovádí automatické zneplatnění patientských vzorků na základě výsledků kontrolního vzorku.
- Dodržujte další požadovaná opatření pro kontrolu kvality, která jsou vyžadována předpisy v daném místě, státě nebo oblasti a požadavky na akreditaci.

Další informace o opakování běhů sekvenování nebo testech knihoven viz [Řešení problémů na straně 84](#).

Řešení problémů

K řešení problémů v pracovním postupu můžete použít následující tabulku. Pokud se běh sekvenování nebo příprava knihovny pro vzorek dvakrát nezdaří, je nutné provést dodatečné řešení problémů. Obrátte se na technickou podporu Illumina.

Pozorování	Možná příčina	Doporučený postup
Běh sekvenování nevyhovuje specifikacím kontroly kvality.	• Chyba směšování • Chyba ředění • Neúplná tepelná denaturace PRL/PDL • Problémy s přípravou spotřebního materiálu pro sekvenování (například nezmrznutí, kondenzace/nečistoty na průtokové kyvetě)	• Opakujte sekvenování z desky PCR z normalizovaných knihoven (NL). Viz Příprava na sekvenování na straně 73.
	• Nesprávné použití obohacených sond (například sond OPR1 používaných pro vzorky DNA, sond OPD2 používaných pro vzorky RNA) • Chyba v pracovním postupu přípravy knihovny během prvního kroku hybridizace nebo po něm.	Opakujte kroky obohacení knihovny z desky PCR se vzorky z amplifikovaných knihoven (ALS). Viz Nastavení první hybridizace na straně 57 .
	Nebyly splněny požadavky na vstupní materiál vzorků	Začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz Denaturace a žihání RNA na straně 43 nebo Fragmentace gDNA na straně 48 .
	Chyba v pracovním postupu přípravy knihovny během nebo před krokem indexování PCR	Opakujte kroky obohacení knihovny z desky PCR se vzorky z amplifikovaných knihoven (ALS). Viz Nastavení první hybridizace na straně 57 .
	Problém s přístrojem	Obrátte se na technickou podporu Illumina.

Pozorování	Možná příčina	Doporučený postup
Chyba při generování výkazu nebo obecná chyba přístroje (chyba sítě, chyba při vkládání/odebírání reagentů atd.)	Problém se softwarem nebo přístrojem	Nápovědu pro generování sestavy uvádí Průvodce pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661). Další nápovědu získáte od technické podpory společnosti Illumina.
Knihovna DNA nevyhovuje specifikacím kontroly kvality.	Nebyly splněny požadavky na vstupní materiál vzorků.	Zajistěte vhodný vstupní materiál vzorků a opakujte přípravu knihovny od kroku Fragmentace gDNA. Viz Požadavky vzorků na straně 26 a Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27 .
	Chybné použití nebo závada vybavení v pracovním postupu rozboru.	Opakujte přípravu knihovny od jednoho z následujících kroků v závislosti na tom, kde došlo k domněle chybnému použití nebo závadě vybavení. Pokud došlo k neznámé nebo jiné chybě, obraťte se v rámci odstraňování chyby běhu na technickou podporu Illumina. • Opakujte sekvenování z desky PCR z normalizovaných knihoven (NL). Viz Příprava na sekvenování na straně 73. • Opakujte kroky obohacení knihovny z desky PCR se vzorky z amplifikovaných knihoven (ALS). Viz Nastavení první hybridizace na straně 57. • Začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz Fragmentace gDNA na straně 48.

Pozorování	Možná příčina	Doporučený postup
	Kritéria pro CONTAMINATION_SCORE a CONTAMINATION_P_VALUE nejsou splněna.	Řiďte se informacemi v části Varování a preventivní opatření, abyste křížové kontaminaci předešli. Zkontrolujte rozvržení desky a indexování knihovny, abyste měli jistotu, že knihovny stejného indexu nebyly sekvenovány dohromady. U dotčených knihoven začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz Fragmentace gDNA na straně 48 . Během extrakce vzorku mohlo dojít ke kontaminaci. Může být nutné extrakci opakovat, aby se zajistilo, že je vzorek bez kontaminace.
	Použitelná MSI selhala.	Zkontrolujte nastavení pro použití a provoz od výrobce ultrasonikátoru (včetně vodní hladiny a typu zkumavky). Zajistěte pro rozbor odpovídající vstupní vzorky. Viz Požadavky vzorků na straně 26 a Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27 . Pokud je vzorek příliš fragmentovaný nebo poškozený, může být nutné provést extrakci nového vzorku nebo zopakovat krok Fragmentace gDNA.
	Vzorek je nadměrně fragmentovaný, nebo má poškozené nukleové kyseliny, což má dopad na schopnost generovat dostatečné jedinečné knihovny.	Zkontrolujte Nastavení konfigurace ultrasonikátoru pro fragmentaci DNA na straně 22 a nastavení výrobce ultrasonikátoru pro použití a provoz (včetně hladiny vody a typu zkumavky). Zajistěte pro rozbor odpovídající vstupní vzorky. Viz Požadavky vzorků na straně 26 a Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27 . Pokud je vzorek příliš fragmentovaný nebo poškozený, může být nutné provést extrakci nového vzorku nebo zopakovat krok Fragmentace gDNA.

Pozorování	Možná příčina	Doporučený postup
Knihovna RNA nevyhovuje specifikacím kontroly kvality.	Nebyly splněny požadavky na vstupní materiál vzorků.	Zajistěte vhodný vstupní materiál vzorků a opakujte přípravu knihovny od kroku Denaturace a žíhání RNA. Viz Požadavky vzorků na straně 26 a Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27 .
	Chybné použití nebo závada vybavení v pracovním postupu rozboru.	Opakujte přípravu knihovny od jednoho z následujících kroků v závislosti na tom, kde došlo k domněle chybnému použití nebo závadě vybavení. Pokud došlo k neznámé nebo jiné chybě, obraťte se v rámci odstraňování chyby běhu na technickou podporu Illumina. • Opakujte sekvenování z desky PCR z normalizovaných knihoven (NL). Viz Příprava na sekvenování na straně 73. • Opakujte kroky obohacení knihovny z desky PCR se vzorky z amplifikovaných knihoven (ALS). Viz Nastavení první hybridizace na straně 57. • Začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz Denaturace a žíhání RNA na straně 43.
	Vzorek je nadměrně fragmentovaný, nebo má poškozené nukleové kyseliny, což má dopad na schopnost generovat dostatečné jedinečné knihovny.	Zajistěte odpovídající vstupní vzorky. Viz Požadavky vzorků na straně 26 a Extrakce nukleové kyseliny, kvantifikace a skladování na straně 27 . Pokud je vzorek příliš fragmentovaný nebo poškozený, může být nutné provést extrakci nového vzorku.

Pozorování	Možná příčina	Doporučený postup
Selhání pozitivní kontroly (DNA/RNA).	Nebyly splněny požadavky na vstupní materiál vzorků pro pozitivní kontrolu.	Zajistěte pro rozbor odpovídající vstup. Zkontrolujte rozvržení desky a zajistěte, aby byly v požadovaných jamkách příslušné reagencie (sondy, indexy). Zajistěte, že je pozitivní kontrolní vzorek skladován podle štítku. Pro všechny vzorky, které využívají danou pozitivní kontrolu, opakujte přípravu knihovny od jednoho z následujících kroků v závislosti na tom, kde došlo k domněle chybnému použití nebo závadě vybavení. Pokud došlo k neznámé nebo jiné chybě, obraťte se v rámci odstraňování chyby běhu na technickou podporu Illumina. • Opakujte sekvenování z desky PCR z normalizovaných knihoven (NL). Viz Příprava na sekvenování na straně 73. • Opakujte kroky obohacení knihovny z desky PCR se vzorky z amplifikovaných knihoven (ALS). Viz Nastavení první hybridizace na straně 57. • Začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz Denaturace a žíhání RNA na straně 43 nebo Fragmentace gDNA na straně 48.
	Chybné použití nebo závada vybavení v pracovním postupu rozboru.	
Selhání NTC (DNA/RNA).	Došlo ke křížové kontaminaci nebo ke kontaminaci pracovního prostoru.	Informace o dekontaminaci pracovních prostor a zamezení křížové kontaminaci naleznete v části Varování a preventivní opatření. Zkontrolujte rozvržení desky a indexování knihovny, abyste měli jistotu, že knihovny stejného indexu nebyly sekvenovány dohromady. Opakujte přípravu knihovny od začátku pracovního postupu pro všechny knihovny, které používají stejnou kontrolu bez templátu.
	Nesprávné indexování knihovny.	
Software indikuje, že v běhu sekvenování nebyly zařazeny pozitivní nebo negativní kontroly.	Nesprávné určení typu nádorového onemocnění v plánování běhu v Local Run Manager.	Analýzu znovu zařadte s kontrolami správně označenými podle pokynů v Průvodci pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661)).

Charakteristiky účinnosti

TSO Comprehensive (EU) je cílený panel NGS detekující změny v 517 genech. Ve všech 517 genech lze vykázat malé varianty DNA (jednonukleotidové varianty [SNV], vícenukleotidové varianty [MNV], inserce a delece). Nádorová mutační zátěž se uvádí jako skóre na základě počtu neřídících somatických variant na megabázi (podrobnosti viz *Průvodce pracovními postupy pro analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661)). MSI je vykázáno jako stav. Genové amplifikace jsou vhodné k vykázání z genů MET a ERBB2. Fúze jsou vhodné k vykázání z 23 genů uvedených v [Shrnutí a vysvětlení rozboru na straně 1](#). Splice varianty jsou vhodné k vykázání z genů MET a EGFR. Aby mohly být varianty vykázány, musí být zjištěny a prokázány v rozboru TSO Comprehensive (EU) za použití znalostní báze a musí být vhodné na základě testovaného typu tkáně. Fúze NTRK vyžadují, aby byl partner fúze 5' a kinázová doména NTRK neporušená.

U malých variant DNA byl uplatněn reprezentativní přístup k validaci cílených genů v panelu s daty reprezentujícími SNV, MNV, inserce a delece. Pro genové amplifikace, fúze a splice varianty bylo provedeno testování na úrovni genu. TMB a MSI byly vyhodnoceny tam, kde byly indikovány. Pro tvrzení CDx o fúzích NTRK byly fúze ve vzorcích FFPE testovány ve studiích zaměřených na výkon konkrétní pro toto tvrzení (jako je mez detekce, konzistence výsledků v rámci laboratoře, reprodukovatelnost, přesnost a klinická účinnost).

[Tabulka 42](#) uvádí definice metrik vypočítaných v různých studiích.

Tabulka 42 Definice metrik

Termín	Definice
Procento pozitivní shody (PPA)	Procento správně identifikovaných pozitivních případů z celkového počtu pozitivních případů vzhledem k ortogonální metodě.
Procento negativní shody (NPA)	Procento správně identifikovaných negativních případů z celkového počtu negativních případů vzhledem k ortogonální metodě.
Celková procentuální shoda (OPA)	Procento správně identifikovaných pozitivních a negativních případů z celkového počtu pozorování vzhledem k ortogonální metodě.
Procento pozitivních přiřazení (PPC)	Procento pozorování, která jsou pro cíl pozitivní, z pozorování, u kterých se očekává, že budou pro cíl pozitivní.
Procento negativních přiřazení (PNC)	Procento pozorování, která jsou pro cíl negativní, z pozorování, u kterých se očekává, že budou pro cíl negativní.

Termín	Definice
n/N	Počet pozitivních nebo negativních pozorování (n) dělený celkovým počtem pozorování (N) pro výpočet PPC nebo PNC. Hodnoty n a N mohou být na různých úrovních (např. varianta nebo gen) nebo kombinovány v celé skupině (např. SNV).
Směrodatná odchylka (SD)	Míra rozptylu hodnot proměnné kolem jejího průměru.
Procentní variační koeficient (%CV)	Standardní odchylka vydělená průměrem jako procento.

Křížová kontaminace

Studie křížové kontaminace byla provedena tak, aby se vyhodnotilo, zda z důvodu kontaminace jamka-jamka během přípravy knihovny vzorků a kontaminace běh-běh mezi následnými běhy sekvenování nedochází k falešně pozitivním výsledkům. Tato analýza byla provedena pro malé varianty DNA (což také ovlivňuje TMB), fúze, amplifikace genů a MSI. Knihovny byly připraveny z charakterizovaných vzorků v šachovnicovém uspořádání, kde se střídaly vzorky za účelem vyhodnocení kontaminace jamka-jamka, a se střídáním indexů k vyhodnocení kontaminace běh-běh při sekvenování, kdy probíhá následné sekvenování na stejném Přístroji NextSeq 550Dx. Studie křížové kontaminace ukázala události s nulovou kontaminací, což bylo pozorováno zkoumáním detekovaných variant v každém vzorku. Nebyly detekovány žádné falešné positivity.

Pro rozbor TSO Comprehensive (EU) byly navrženy dvě metriky kontroly kvality (CONTAMINATION_SCORE a P_VALUE) k detekci kontaminace vzorku ve vzorcích DNA. Byla vyhodnocena citlivost detekce kontaminace. Vzorky nádorové DNA FFPE byly smíchány s různými množstvími vzorků normální DNA FFPE za účelem vytvoření účelově kontaminovaných vzorků.

Celkem bylo generováno 1 112 pozorování kontaminace a kontaminace byla detekována v 95 % (1 054) pozorování. Míra detekce se zvýšila na 96 % (939/976), když procento kontaminace bylo mezi 10 % a 90 % (hmota/hmota). Z 37 pozorování v rozmezí 10 % až 90 % kontaminace, kde kontaminace nebyla zjištěna, jich 12 nesplňovalo specifikaci pokrytí pro přiřazení malých variant DNA. Nízké pokrytí ztěžuje detekci kontaminace, ale nejsou hlášeny malé varianty DNA, které by vliv kontaminace zmírňovaly. Patnáct pozorování nesplnilo specifikaci amplifikace genu (metrická kontrola kvality mediánu zásobníků) pro přiřazení amplifikace genu. U vzorků by nebyl zaznamenán žádný výsledek amplifikace genu.

Očekává se, že rozbor TSO Comprehensive (EU) ve studii bude mít nízký výskyt křížové kontaminace jamka-jamka nebo běh-běh. Tyto výsledky spolu s metrikami kontaminace v softwaru snižují riziko falešných výsledků variant v důsledku kontaminace vzorku.

Hodnocení sad pro extrakci nukleové kyseliny

Rozborem TSO Comprehensive (EU) byly hodnoceny tři komerčně dostupné sady pro extrakci DNA a RNA. Tyto tři sady pro extrakci izolovaly DNA i RNA ze stejných částí tkání FFPE. Sady se lišily deparafinizačním činidlem a postupem vazby nukleové kyseliny ([Tabulka 43](#)). Převažující sadou pro extrakci používanou k určení účinnosti TSO Comprehensive (EU) byla sada 1.

Tabulka 43 Charakteristika sady

Sada	Deparafinizační činidlo	Vazba nukleové kyseliny
1	Vlastní	Sloupcová
2	Xylen	Sloupcová
3	Minerální olej	Magnetické částice

Tabulka 44 a Tabulka 45 shrnují vliv sad pro extrakci na platnost knihovny a přiřazování variant. Byl zaznamenán rozdíl, pokud se střední hodnoty u sad pro extrakci výrazně lišily. Průměrné rozdíly mezi sadami pro extrakci byly vypočteny pomocí sady 1 jako kontrolní sady, protože sada 1 byla použita k extrakci většiny nukleových kyselin používaných v analytických studiích TSO Comprehensive (EU). Průměrný rozdíl ve srovnání se sadou 1 byl uveden pro ilustraci toho, jak by různé extrakční sady ovlivnily ostatní analytické studie TSO Comprehensive (EU).

Tabulka 44 Vliv sady pro extrakci na platnost knihovny

Typ varianty	Metriky kontroly kvality knihovny	Průměrný rozdíl ve srovnání se sadou 1
Malé varianty DNA / TMB	Medián pokrytí exonu (počet) PCT Exon 50X (%) Medián velikosti inzertu (bp)	Sada 2 nižší o 56 čtení Sada 3 vyšší o 0,298 % Sada 2 a sada 3 nižší o 3 bp
DNA MSI	Použitelné lokality MSI	Sada 3 vyšší o 8 lokalit
Genová amplifikace DNA	Pokrytí MAD (počet) Medián počtu zásobníků	Sada 2 nižší o 0,0043 Sada 2 nižší o 0,5825, sada 3 vyšší o 0,3086
RNA (fúze / splice varianty)	Medián velikosti inzertu (bp) Protokol (Medián CV Gene500X) Celkový počet cílových čtení	Sada 3 vyšší o 2 bp Sada 2 vyšší o 0,029 Žádný významný rozdíl

Bylo zjištěno, že sady pro extrakci 2 a 3 mají větší počet podpůrných čtení, takže fúze a varianty splice v blízkosti LoD mají vyšší pravděpodobnost detekce v důsledku výběru extrakční sady.

Tabulka 45 Vliv sady pro extrakci na přiřazení variant

Typ varianty (jednotky)	Přiřazení variant (průměrný rozdíl ve vztahu k sadě 1)
Malé varianty DNA (VAF)	Technicky nevýznamné Cílené varianty: rozptyl mezi sadami byl malý v porovnání se zbytkovým rozptylem. Necílené varianty: Žádné významné rozdíly u prvních dvou zásobníků VAF. Při pozorování statistické významnosti nebyly zjištěny žádné významné rozdíly.

Typ varianty (jednotky)	Přirazení variant (průměrný rozdíl ve vztahu k sadě 1)
TMB (mutace na megabázi)	Technicky nevýznamné, odchylka mezi sadami byla malá ve vztahu ke zbytkovým
MSI (% nestabilních lokalit)	Sada 3 nižší o 1,9 % nestabilních lokalit
Genové amplifikace (míra exprese)	Sada 2 (0,06) a sada 3 (0,08) pro vyšší míru exprese
Fúze (podporující čtení)	U sady 2 došlo k 51% nárůstu a u sady 3 k 23% nárůstu počtu podporujících čtení.
Variety splice (podporující čtení)	U sady 2 a 3 došlo k 48% nárůstu počtu podporujících čtení.

Interferující látky

Byl vyhodnocen vliv potenciálních endogenních a exogenních látek na účinnost testu TSO Comprehensive (EU). Endogenní látky (melanin a hemoglobin) byly do vzorků přidány během procesu extrakce nukleové kyseliny. Exogenní látky (ethanol, xylen a proteináza K) byly během procesu extrakce nukleové kyseliny přítomny a byly rovněž přidány do purifikované nukleové kyseliny před přípravou knihovny. Pokud byla během extrakčního procesu pozorována interference s obohacenou proteinázou K, hodnotili se také zvýšené koncentrace proteinázy K. Během přípravy knihovny byly přidány nadbytečné indexační primery (15 % a 30 %). S výjimkou indexačních primerů byly látky přidány do FFPE vzorků mozku, prsu, tlustého střeva, plic, medulární štítné žlázy, NSCLC, vaječníků, prostaty, slin, kůže, měkkých tkání a tkáně štítné žlázy – osm vzorků bylo extrahováno pro analýzu DNA a 13 bylo extrahováno pro analýzu RNA. Pro indexační primery bylo pro analýzu DNA použito šest FFPE vzorků ze tří různých typů tkání (štítná žláza, močový měchýř, tračník) a pro analýzu RNA bylo použito pět FFPE vzorků ze čtyř různých typů tkání (plíce, štítná žláza, tračník, prs). Pro každý z 16 jedinečných vzorků byla použita endogenní kontrola bez příměsí a exogenní kontrola s příměsí pufru nebo vody. Vliv nekrózy byl posouzen na jiné sadě osmi vzorků FFPE z tkáně mozku, tlustého střeva a plic. Pro každý nekrotický vzorek existoval makroskopicky rozčleněný kontrolní vzorek bez nekrózy. Pro všechny interferující látky byly rozbořem TSO Comprehensive (EU) testovány čtyři replikáty na každý vzorek a každou látku a porovnány s jejich příslušnými kontrolními podmínkami pro detekci malých variant DNA, genových amplifikací, fúzí RNA a splice variant RNA, stejně jako stav MSI a skóre TMB. Byly zahrnuty varianty profilování CDx i tumoru.

Detekce variant DNA

Melanin (0,2 µg/ml), hemoglobin (2 mg/ml), ethanol (5 %), proteináza K (0,04 mg/ml v nukleové kyselině) a xylen (0,0001 %) neovlivňují skóre TMB, stav MSI, malé varianty DNA a genové amplifikace.

Detekce variant RNA

Data neprokazují vliv melaninu (0,2 µg/ml), ethanolu (5 %) a xylenu (0,0001 %) na fúze nebo splice varianty RNA. Hemoglobin (2 mg/ml) interferoval (snížil počet podpůrných čtení) se třemi různými splice variantami v genu MET. Splice varianta v genu AR (tři různé vzorky) a v genu EGFR (jeden vzorek) nebyly ovlivněny. Pokud laboratoř provádí analýzu RNA, je třeba se při získávání řezů z bloku tkáně vyhnout tkáním s hemoglobinem nebo minimalizovat množství hemoglobinu v tkáni.

Proteináza K (0,04 mg/ml v nukleové kyselině) interferovala s fúzí RNA a splice variantami. Proteináza K byla během extrakce testována v koncentraci 2,6 mg/ml a 5,2 mg/ml, což je 2x a 4x standardní koncentrace v komerčně dostupné sadě. Fúze byly inhibovány při 4x vyšší koncentraci proteinázy K, ale ne při 2x vyšší koncentraci. Splice varianty byly inhibovány proteinázou K při 2x vyšší koncentraci. Proteináza K nebo ekvivalentní enzym by neměly být během extrakce zvýšeny ze standardní koncentrace uvedené v extrakční sadě.

Počet podpůrných čtení splice variant se snižuje při 30% nadbytku indexačních primerů, ale při 15% nadbytku nikoli.

Nekróza

Přítomnost nekrotické tkáně do 70 % neovlivňovala skóre TMB, stav MSI ani malé varianty DNA. Ve vzorcích s nekrotickým obsahem ≥ 25 % respektive ≥ 23 % (na základě plochy) v oblasti tkáně byly sníženy detekce variant RNA (podpůrné čtení) respektive amplifikace genů (složené změny). Pokud části vzorků obsahují ≥ 23 % nekrotické tkáně v celkové oblasti tkáně, musí se nekrotická tkáň makroskopicky rozčlenit.

Stabilita

Stabilita v reálném čase

Stabilita v reálném čase byla použita ke stanovení doby skladovatelnosti sady rozboru TSO Comprehensive (EU), když je skladována dle vyznačených podmínek. Plán studie byl založen na testování tří šarží činidel a používal klasický plán studie stability popsán v CLSI EP25-A. Soupravy byly po dobu trvání studie skladovány v konečné konfiguraci soupravy za podmínek skladování definovaných na štítku produktu. Zmrazené složky soupravy byly skladovány při teplotě -15 °C až -25 °C, chlazené při teplotě 2 až 8 °C.

Sady byly testovány z hlediska vzhledu a akceptačních kritérií funkčnosti ve stanovených časových bodech. Také byly analyzovány trendy přiřazení variant a metrik kontroly kvality vzorku pro kontrolní materiál kontroly kvality. Pro každou reagensii byla určena skladovatelnost. Data expirace jsou určena na základě data výroby a doby skladovatelnosti. Expirace sady je přiřazena podle reagensie s nejdřívější expirací.

Stabilita používané sady

Stabilita používání sady rozboru TSO Comprehensive (EU) byla hodnocena za podmínek standardního využití v průběhu doby skladovatelnosti pro podporu používání více sad. Sada reagensií podléhala opakovanému zmrazení/rozmrazení a bylo testováno, zda sada podporuje až 4 použití. Dále bylo celkem 3krát připraveno 8

knihoven RNA a 8 knihoven DNA pro účely testování maximálního počtu podporovaných knihoven (24 knihoven DNA a 24 knihoven RNA na sadu). U všech cyklů zmrazení/rozmrazení a testovaných časových bodů byla splněna veškerá kritéria funkčnosti sady. K posouzení vlivu testování při použití na přiřazení variant bylo provedeno testování vzorků FFPE s reagensii o stáří ≥ 25 měsíců. Kvalitativní analýza cílených variant prokázala, že události při použití neměly vliv na přiřazení variant.

Stabilita nukleové kyseliny

Stabilita nukleových kyselin (DNA a RNA) a jejich související kvantifikace pro použití s rozbořem TSO Comprehensive (EU) byly vyhodnoceny pomocí vzorků FFPE z více typů tkání. Bloky FFPE byly rozřezány a všechny nukleové kyseliny byly extrahovány najednou. Extrahovaná nukleová kyselina byla důkladně promíchána, kvantifikována, zkontrolována z hlediska kvality a rozdělena do dvou sad jednorázových zkumavek, které se mají zmrazit ve dvou časových bodech: Kontrolní test T0 (výchozí stav) a test T1 (≥ 28 dnů). Veškerá extrahovaná RNA byla uchovávána při teplotě -85°C až -65°C a veškerá extrahovaná DNA byla uchovávána při teplotě -25°C až -15°C po uvedenou dobu a poté zpracována rozbořem TSO Comprehensive (EU) napříč více replikáty a operátory. Podmínky testu T1 byly porovnány s kontrolou stavu MSI, skóre TMB, amplifikací genů, malých variant DNA, fúzí RNA a variant sestřihu RNA. Údaje naznačují, že nukleové kyseliny a jejich související kvantifikace pro použití v rozboru TSO Comprehensive (EU) jsou stabilní po dobu až 28 dnů, pokud jsou uchovávány při doporučených teplotách (RNA při -85°C až -65°C a DNA při -25°C až -15°C).

Stabilita knihovny

Stabilita knihoven využívajících každý ze šesti bodů bezpečného přerušení pro daný rozbor (viz [Tabulka 5](#)) byla hodnocena pomocí vzorků FFPE z více typů tkání. Kontrolní knihovny (T0, bez bodů přerušení) byly sekvenovány okamžitě na konci pracovního postupu. Na podporu údajů o dnech uvedených v [Tabulka 5](#) byly alikvoty ze stejných knihoven byly po dobu (T1) drženy v bodech přerušení při -25°C až -15°C . T1 byla porovnána s T0 u malých variant DNA, TMB, genových amplifikací, MSI, fúzí RNA a splice variant RNA s variantami CDx a profilování nádoru. Data ukazují, že knihovny generované z rozboru TSO Comprehensive (EU) jsou stabilní v souladu s návodem k použití.

Stabilita sklíček s tkání FFPE

Stabilita sklíček s tkání FFPE pro použití s rozbořem TSO Comprehensive (EU) byla hodnocena vytvořením řezů z bloků FFPE (řezy $5\text{ }\mu\text{m}$) z různých vzorků, instalací na sklíčko a následně skladováním při průměrné pokojové teplotě (22°C) ve 2 časových bodech. RNA byla extrahována a uchovávána při teplotě -65°C až -85°C a DNA byla extrahována a uchovávána při teplotě -15°C až -25°C po dobu kratší než 1 týden před testováním. Materiál nukleové kyseliny byl kvantifikován a poté zpracován rozbořem TSO Comprehensive (EU) do 24 hodin pro každý časový bod. V každém časovém bodě bylo testováno TSO Comprehensive (EU) více replikátů a operátorů na vzorek a porovnáno s časovým bodem T0 pro varianty MSI, TMB, genové amplifikace, malé varianty DNA, fúze RNA a sestřihové varianty RNA, včetně variant CDx a profilování nádoru. Přiřazení varianty bylo vyhodnoceno a splnilo všechna kritéria přijatelnosti, což naznačuje, že tkáň FFPE instalovaná na sklíčko pro použití v rozboru TSO Comprehensive (EU) jsou stabilní při pokojové teplotě po dobu až 4 týdnů (28 dnů).

Je třeba poznamenat, že po 4 týdnech (28 dnech) byl zjištěn 10% pokles míry validity QC knihoven MSI v důsledku kombinace operátora a doby skladování. U fúzí a splice variant RNA došlo po 4 týdnech (28 dnech) skladování na sklíčkách k přibližně 29% poklesu podpůrných čtení.

Guardbanding titrace vstupu nukleové kyseliny

Vstup nukleové kyseliny pro rozbor TSO Comprehensive (EU) byl hodnocen pomocí testování DNA ze 33 vzorků FFPE, které zahrnovaly 17 typů tkáně při úrovni vstupů v rozsahu od 10 ng do 500 ng a testování RNA z 5 vzorků FFPE z 5 typů tkáně při úrovni vstupů v rozsahu 10 ng až 85 ng. Byly vyhodnoceny metriky kontroly kvality knihovny, které závisely na vzorku. Výsledky pro DNA prokázaly, že některé (ne všechny) metriky kontroly kvality vzorku DNA odpovídaly většímu vstupu, než je běžný vstup 40 ng:

- Metrika MEDIAN_INSERT_SIZE nereagovala na vstup nad 30 ng.
- Metrika MEDIAN_EXON_COVERAGE ukázala pozitivní korelaci se zvýšeným vstupem.
- Metrika PCT_EXON_50X se zvýšila při zvýšení vstupu až na 80 ng.
- Metrika USABLE_MSI_SITES se se zvýšeným vstupem zvýšila. Některé vzorky s méně než 40 USABLE_MSI_SITES při 40 ng splňovala specifikace při vyšších vstupech, což umožní výpočet skóre MSI.
- Metrika MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET se se zvýšeným vstupem zvýšila.
- Zvýšení vstupu zvyšuje COVERAGE_MAD směrem k horní mezi specifikace.

Metriky kontroly kvality vzorku RNA se zvýšily (MEDIAN_INSERT_SIZE a TOTAL_ON_TARGET_READS) nebo snížily (MEDIAN_CV_GENE_500X) mezi 10 ng a 40 ng, ale obecně se neměnily při změnách vstupu mezi 40 ng a 85 ng.

Mez blanku

Procento falešné positivity (z celkového počtu očekávaných negativních výsledků) bylo hodnoceno opakovaným testováním normální nebo benigní přilehlé tkáně FFPE, která by neměla obsahovat somatické varianty, na malé varianty DNA, genové amplifikace, MSI, fúze RNA a splice varianty RNA. Falešná pozitivita nebyla u TMB analyzována, protože neexistuje žádná klinická mezní hodnota. Proběhl duplicitní běh se 6 FFPE vzorky DNA a 6 FFPE vzorky RNA za přítomnosti 2 operátorů během 3 dnů pro každou ze 2 šarží reagentů. Podskupina vzorků byla znovu umístěna do fondu a znovu sekvenována ve formátu pouze 3× DNA a 3× RNA za účelem vyhodnocení falešných pozitivit s několika multiplexními konfiguracemi, které toto zařízení podporuje. Kromě toho prošlo duplicitním během dalších 30 vzorků RNA, které se zpracovaly s 1 sadou reagentů, jež byly rozděleny na 2 operátory. Celkem proběhlo 168 možných pozorování DNA a 228 pozorování RNA, snížených použitím neplatných knihoven pro každý typ varianty. Procento falešné positivity bylo vypočteno na úrovni genů pro amplifikace a na úrovni pozic (přibližně 1,9 milionu pozic) pro malé varianty DNA. Procento falešně pozitivních výsledků pro typy variant DNA je uvedeno v [Tabulka 46](#). TSO Comprehensive (EU) nemá žádná tvrzení CDx (úroveň 1) pro malé varianty DNA, takže žádné malé varianty DNA nelze pro úroveň 1 vykazovat jako falešně pozitivní výsledky. 271 falešně pozitivních výsledků bylo vyrovnáno znalostní databází TSO

Comprehensive (EU). Žádné falešně pozitivní výsledky nebyly klinicky významné (úroveň 2). Na úrovni 3 byly 4 falešně pozitivní výsledky pocházející ze 2 variant ve 4 (2,4 %) pozorováních ze 168 pozorování. Procento falešné positivity u fúzí RNA a splice variant bylo 0 %, jak uvádí [Tabulka 47](#).

Tabulka 46 Falešná pozitivita podle typu varianty DNA

Typ varianty	Falešná pozitivita
Genové amplifikace	0 % (0/9912)
Malé varianty DNA	0,0001 % (271 / 295 801 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Není k dispozici*

* Falešná pozitivita se nehodnotí, protože TMB je vykázána jako skóre a nemá kvalitativní výstup.

Tabulka 47 Falešná pozitivita podle typu varianty RNA

Typ varianty	Falešná pozitivita
Fúze	0 % (0/227)
Splice varianta	0 % (0/227)

Mez detekce

Pro vyhodnocení mezí detekce rozboru TSO Comprehensive (EU) byly provedeny dvě studie. Studie 1 posuzovala malé varianty RET DNA, fúze RET a fúze NTRK1–3. Studie 2 posuzovala další varianty profilování nádorů.

Studie 1

Byly určeny meze detekce (LoD) malých variant DNA NTRK1, NTRK3 a RET a fúzí NTRK1–3 a RET. Hodnota LoD představuje nejnížší hodnotu analytu (například frekvence variantních alel nebo podpůrných čtení), kterou lze konzistentně detekovat (95% mez detekce nebo chybu II. typu s hodnotou 5 %). Ve studii byly použity tkáně FFPE s malými variantami DNA RET (medulární karcinom štítné žlázy), fúzemi RET (papilární karcinom štítné žlázy, atypický tumor Spitzové) a fúzemi NTRK1–3 (gliom nízkého stupně, multifonní glioblastom, myofibroblastický sarkom, sarkom, sekreční karcinom prsu, karcinom tlustého střeva), a také buněčnými liniemi FFPE s malými variantami DNA NTRK1 a NTRK3. Každý vzorek byl zředěn na alespoň 5 testovacích úrovních (VAF 0,01–0,10 pro malé varianty DNA a 2–25 podpůrných čtení pro fúze). Pro každou testovací úroveň bylo provedeno 18 pozorování na každou šarži a každou variantu provedených 3 operátory a 3 přístroji pro sekvenování a byla zahájena příprava knihovny ve 3 po sobě nejdoucích dnech se 2 replikáty každé testovací úrovně. Testovány byly dvě šarže reagentů.

Pro varianty DNA byly tyto 2 šarže analyzovány nezávisle pomocí regrese probit nebo na základě četnosti (nejnížší testovací úroveň s četností (bodovým odhadem) ≥ 95 %) k určení LoD pro každou variantu a každou šarži. Větší LoD v obou šaržích reagentů byla vzata jako mez detekce pro variantu ([Tabulka 48](#)).

Pro fúze RNA byly k odhadu hodnot LoD pro každý gen fúze použity buněčné linie FFPE. LoD pak byly ověřeny na tkáních FFPE pomocí duplicitní přípravy knihovny s nasazením 3 operátorů, 3 přístrojů a 3 šarží reagentů při generování 54 pozorování na variantu v blízkosti hodnoty LoD stanovené podle buněčných linií FFPE. Prohlášenou mezi detekce pro každou fúzi ([Tabulka 49](#)) představuje nejnižší střední hodnota podpůrných čtení, která dosáhla četnosti (bodového odhadu) $\geq 95\%$.

Tabulka 48 Meze detekce malých variant DNA NTRK1, NTRK3 a RET

Marker	Chr ¹	Pozice	Referenční	Alternativní	Mez detekce (Frekvence variantní alely)
NTRK1 G595R (SNV) ²	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV) ²	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV) ²	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV) ²	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (delece) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = Chromozom

² Tyto varianty DNA byly analyzovány regresí probit; ostatní varianty DNA byly analyzovány na základě četnosti.

Tabulka 49 Mez detekce pro fúze NTRK a RET

Gen	Fúze	Mez detekce (Podpůrná čtení)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2

Gen	Fúze	Mez detekce (Podpůrná čtení)
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Studie 2

Byly vyhodnoceny meze detekce (LoD) variant profilování nádorů vykázané rozbořem TSO Comprehensive (EU). Hodnota LoD představuje nejnižší hodnotu analytu (frekvence variantních alel, míry exprese nebo podpůrných čtení), kterou lze konzistentně detekovat (95% četnost nebo chyba II. typu s hodnotou 5 %). Vzorky FFPE ze 17 typů tkání obsahující varianty byly zředěny na několik testovacích úrovní. Na každé úrovni bylo provedeno šest pozorování dvěma operátory, z nichž každý používal jinou šarži reagentů a jiný přístroj.

Varianty DNA

LoD 10 tříd malých variant DNA (celkem 25 variant) a 2 genových amplifikací DNA (ERBB2 a MET) byly určeny a shrnuty jako intervaly ([Tabulka 50](#)). Zahrnuty jsou i varianty RET z první studie LoD. Dvě ze 3 inzercí větších než 5 bp měly LoD 0,034 a VAF 0,036, třetí měla LoD 0,215 VAF. To byla inserce s oblastí malé složitosti, kde inserce přidává další opakování, ovlivňuje zarovnání a ke konzistentní detekci je potřeba více čtení. Některé genomové kontexty s malou složitostí by proto mohly mít vliv na detekci inzercí > 5 bp.

Tabulka 50 Mez detekce pro malé varianty DNA a genové amplifikace

Typ (jednotka pro LoD)	Třída varianty / genomový kontext	Počet variant	Rozsah (VAF)
Malé varianty DNA (frekvence variantní alely)	SNV	5	0,016–0,064
	MNV	3	0,022–0,048
	Inzerce (1–2 bp) poblíž homopolymerních opakování	2	0,086–0,104
	Inzerce (1–2 bp) poblíž dinukleotidových opakování	2	0,038–0,051
	Inzerce (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Inzerce (> 5 bp až do 25 bp)	3	0,034–0,215
	Delece (1–2 bp) poblíž homopolymerních opakování	2	0,094–0,100
	Delece (1–2 bp) poblíž dinukleotidových opakování	2	0,033–0,070
	Delece (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Delece (> 5 až do 25 bp)	2	0,047–0,055
Genové amplifikace (míra exprese)	Podle genu (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analýza necílených variant byla provedena ze vzorků ze studie 1, které měly alespoň pět testovacích úrovní. Každá necílená varianta byla analyzována individuálně a LoD byla odhadnuta pouze pro varianty s nejméně jednou úrovní > 0 % a ≤ 95 % četnosti výskytu a nejméně jednou úrovní ≥ 95 % četnosti výskytu. [Tabulka 51](#) ukazuje percentily spolu s minimálními a maximálními LoD pozorovanými podle třídy pro necílené varianty. Necílené varianty poskytují více variant podle třídy, než bylo testováno ve studii 2, a jsou v souladu s rozsahy LoD z [Tabulka 50](#).

Tabulka 51 Souhrnná statistika pro limity detekce podle třídy necílených variant (ze studie 1)

Třída	N	Min	25%	50%	75%	90%	Max
SNV	862	0,020	0,047	0,059	0,079	0,097	0,592
MNV	5	0,038	0,040	0,050	0,086	0,095	0,095
Inzerce	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Delece	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Fúze

LoD byly určeny pro 19 fúzí, započítáno bylo 20 genů v panelu TSO Comprehensive (EU) od 9 do 31,3 podpůrných čtení (Tabulka 52). Další 3 geny (NTRK1–3) byly testovány v jiné studii. Gen RET byl testován zde i ve druhé studii. Šestnáct fúzí s určenými LoD mělo data konzistentní s běžnou LoD 16 podpůrných čtení pomocí oboustranného 95% horního intervalu spolehlivosti (UCL). Dvě fúze měly LoD 24,7 a 31,3 podpůrných čtení, které nebyly konzistentní s běžnou LoD.

Fúze FGFR2-SRPK2 s hodnotou LoD 24,7 podpůrných čtení mělo oblasti překryvu opakování v bodě zlomu, jak uvádí software pro rozbor TSO Comprehensive (EU). Oblasti opakování v bodě zlomu mají typicky nižší úroveň průkaznosti, protože čtení se mohou namapovat v genomu jinde nebo mohou zůstat nezarovnaná. Oblasti opakování navíc komplikují proces sestavení (používaný k identifikaci sekvencí fúzí) a ke zkonstruování správné sekvence potřebují další důkazy. Dalším příkladem fúze se souhlasnou sekvencí v bodě zlomu je SEPT14-EGFR.

Fúze BCL2-IGHJ5 s hodnotou LoD 31,3 podpůrných čtení měla velmi krátký gen (IGHJ5) s bodem zlomu v blízkosti začátku exonu, což vyžaduje krátké zarovnání s mezerou. Proto bylo pro konzistentní detekci potřeba více čtení.

Tabulka 52 Mez detekce pro fúze

Fúze	Bod zlomu genu A	Bod zlomu genu KB	LoD	Běžná LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	ano
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	ano
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	ano
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	ano
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	ano
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	ano
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	ano
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	ano
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	ano
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	ano
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	ne

Fúze	Bod zlomu genu A	Bod zlomu genu KB	LoD	Běžná LoD
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	ano
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	ano
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	ano
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	ano
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	ano
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	ano
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	ne
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	ano

Splice varianty

Dvě splice varianty RNA, MET a EGFR měly každá LoD 18,7 a 16,7 podpůrných čtení.

Obsah nádoru

Výsledky studie podávají doporučení k obsahu nádoru u klinických vzorků. Obecně platí, že čím vyšší je obsah nádoru, tím vyšší je signál (VAF, míra exprese nebo podpůrná čtení) pro varianty v nádoru. Minimální doporučené hodnoty obsahu nádoru jsou založeny na následujících pozorováních. Hodnoty LoD pro malé varianty DNA nejsou větší než VAF 0,104 (s výjimkou inzerce TP53). K detekci řídicích mutací v nádoru (0,50 frekvence variantní alely) je doporučen obsah nádoru 20 %, aby tyto mutace měly VAF 0,10 a byly na úrovni LoD nebo nad ní. Při 20% obsahu nádoru budou geny amplifikované na 5,5 míry exprese (11 kopií) konzistentně detekovány na základě meze detekce na úrovni 1,8 míry exprese. Fúze se 74 podpůrnými čteními budou při 20% obsahu nádoru konzistentně detekovány na základě meze detekce na úrovni 14,7 podpůrných čtení.

Reprodukovatelnost

K posouzení reprodukovatelnosti byly pro rozbor TSO Comprehensive (EU) provedeny dvě studie. Studie 1 hodnotila kromě variant fúzí NTRK a RET také malé varianty DNA RET. Studie 2 hodnotila další varianty profilování nádorů.

Studie 1

K vyhodnocení reprodukovatelnosti rozboru TSO Comprehensive (EU) byla tato studie provedena na 3 testovacích pracovištích (1 interním, 2 externích), se 2 operátory na každém pracovišti, 2 replikáty v rámci běhu ve 3 testovacích dnech nejdoucích po sobě. Testování bylo provedeno s panelem reprodukovatelnosti zahrnujícím vzorky DNA obsahující konkrétní známé malé varianty DNA RET a vzorky RNA obsahující konkrétní známé varianty fúzí NTRK1–3 a RET ze vzorků tkání a buněčných linií fixovaných formalínem a zalitých do parafínu (FFPE). Členy panelu byly DNA a RNA s nízkou úrovní variant a vysokou úrovní variant, přičemž pro každou třídu variant byl stejný počet členů panelu s nízkou a vysokou úrovní variant. Členové panelu na vysoké

úrovni byli cíleni na cca dvojnásobek až trojnásobek LoD a členové panelu na nízké úrovni byli cíleni přibližně na LoD. Na každém pracovišti testoval každý operátor třikrát členy panelu v duplicitách a vygeneroval tak 6 pozorování pro každý cíl a každého člena panelu. Ze všech 3 pracovišť bylo vygenerováno 36 pozorování na každého člena panelu (3 pracoviště/přístroje × 2 operátoři × 2 replikáty v běhu × 3 počáteční dny).

PPC a PNC pro cílené malé varianty DNA a pro cílené varianty fúzí RNA na vysoké úrovni byly určeny jako primární koncové body. PPC a PNC pro cílené malé varianty DNA a pro cílené varianty fúzí RNA na nízké úrovni bylo vypočítáno jako sekundární koncové body. 95% oboustranné intervaly spolehlivosti (CI) přidružené ke koncovým bodům byly vypočítány Wilsonovou metodou hodnocení. Pro odhad PPC a PNC (s přidruženými 95% intervaly spolehlivosti) u členů cíleného panelu na vysoké úrovni byly provedeny primární analýzy kombinací pozorování rozboru TSO Comprehensive (EU) pro daný cíl ve skupině členů panelu představující příslušnou třídu variant (například malé varianty DNA a fúze RNA) u všech pracovišť/přístrojů, operátorů a běhů. Pro každou cílenou variantu byla pro výpočet PNC zkombinována pozorování rozboru TSO Comprehensive (EU) u ostatních členů panelu na vysoké úrovni cílená pro stejný typ varianty, ale neobsahující stejnou variantu podle většinového pravidla. Celkové PPC a PNC pro členy cíleného panelu na nízké úrovni bylo určeno podobným způsobem.

Malé varianty DNA RET

U členů panelu malých variant DNA na vysoké úrovni bylo celkové PPC 100,0 % (207/207; 95% CI: 98,2 % až 100,0 %) ([Tabulka 53](#)). Celkové PNC bylo u členů panelu malých variant DNA na vysoké úrovni 100,0 % (1 035/1 035; 95% CI: 99,6 % až 100,0 %) ([Tabulka 54](#)). U členů cíleného panelu malých variant DNA na nízké úrovni bylo celkové PPC 99,1 % (210/212; 95% CI: 96,6 % až 99,7 %) a celkové PNC bylo 100,0 % (1 026/1 026; 95% CI: 99,6 % až 100,0 %).

Tabulka 53 PPC rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci malých variant DNA RET u členů cíleného panelu na vysoké a nízké úrovni

Úroveň varianty	Typ varianty	Cílená varianta (Nukleotid)	Cílená varianta (Aminokyselina)	N	Střední hodnota VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Delece	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Inzerce	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Všechny malé varianty DNA vysoké úrovně	Všechny malé varianty DNA vysoké úrovně	Všechny malé varianty DNA vysoké úrovně	207	Není k dispozici ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Delece	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Inzerce	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Všechny malé varianty DNA nízké úrovně	Všechny malé varianty DNA nízké úrovně	Všechny malé varianty DNA nízké úrovně	212	Není k dispozici ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Zkratky: N/A, není k dispozici; VAF – frekvence variantní alely.² 95% oboustranný interval spolehlivosti vypočítaný Wilsonovou metodou hodnocení.

Tabulka 54 PNC rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci malých variant DNA RET u členů cíleného panelu na vysoké a nízké úrovni

Úroveň varianty	Typ varianty	Cílená varianta (Nukleotid)	Cílená varianta (Aminokyselina)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Delece	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Inzerce	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Všechny malé varianty DNA vysoké úrovně	Všechny malé varianty DNA vysoké úrovně	Všechny malé varianty DNA vysoké úrovně	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Delece	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Inzerce	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Všechny malé varianty DNA nízké úrovně	Všechny malé varianty DNA nízké úrovně	Všechny malé varianty DNA nízké úrovně	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Všechna pozorování shromážděná z kombinací členů panelů a variant, pro které je většinové přiřazení negativní (fúze cílených variant s méně než 50 % pozitivních přiřazení).

² 95% oboustranný interval spolehlivosti vypočítaný Wilsonovou metodou hodnocení.

Tabulka 55 ukazuje analýzu složek rozptylu frekvencí variantních alel (VAF) v přibližně 36 pozorováních pro každého člena panelu. Pro každou cílenou malou variantu DNA RET byla vypočtena a uvedena směrodatná odchylka (SD) a procentní variační koeficient (%CV; celkem a pro každý zdroj).

Tabulka 55 Analýza složek rozptylu VAF rozboru TSO Comprehensive (EU) u členů cíleného panelu malých variant DNA

Úroveň varianty	Typ varianty	Cílená varianta (Nukleotid)	Cílená varianta (aminokyselina)	N	Střední hodnota VAF	SD pracoviště (%CV)	SD operátora (%CV)	SD dne (%CV)	SD replikátu (%CV)	Celková SD (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Delece	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (5,5)	0,017 (8,6)	0,020 (10,2)
	Inzerce	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,6)	0,010 (10,1)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (22,2)	0,009 (22,2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0)	0,003 (9,8)	0,002 (6,2)	0,007 (21,7)	0,008 (24,6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,008 (17,5)	0,008 (18,5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0)	0,008 (10,7)	0,000 (0,0)	0,011 (14,9)	0,013 (18,4)
	Delece	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	0,002 (2,5)	0,006 (9,9)	0,004 (6,4)	0,010 (16,2)	0,013 (20,2)
	Inzerce	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8)	0,000 (0,0)	0,003 (9,1)	0,006 (15,9)	0,008 (22,9)

Fúze NTRK 1–3 a RET

Pro členy panelu fúzí RNA na vysoké úrovni bylo celkové PPC 99,3 % (285/287; 95% CI: 97,5 % až 99,8 %) (Tabulka 56). PPC bylo 100 % pro každého člena panelu na vysoké úrovni kromě člena panelu BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95% CI: 81,9 % až 98,5 %]). Celkové PNC pro členy panelu fúzí RNA na vysoké úrovni bylo 100,0 % (1 724/1 724; 95% CI: 99,8 % až 100,0 %) (Tabulka 57). Pro členy cíleného panelu fúzí RNA na nízké úrovni bylo celkové PPC 95,4 % (272/285; 95% CI: 92,3 %, 97,3 %) a celkové PNC bylo 100,0 % (1 851/1 851; 95% CI: 99,8 % až 100,0 %).

Tabulka 56 PPC rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci fúzí NTRK a RET u členů cíleného panelu na vysoké a nízké úrovni

Úroveň varianty	Cílené fúze	N	Střední hodnota podpůrných čtení	PPC (%) (n/N)	95% CI*
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Vysoká: všechny fúze	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 (29/36)	(65,0, 90,2)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 (33/34)	(85,1, 99,5)
	Nízká: všechny fúze	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* 95% oboustranný interval spolehlivosti (CI) vypočítaný Wilsonovou metodou hodnocení.

Tabulka 57 PNC rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci fúzí NTRK a RET u členů necíleného panelu na vysoké a nízké úrovni

Úroveň varianty	Cílené fúze	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5 %, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5 %, 100,0)
	Vysoká: všechny fúze	1724	100,0 (1 724/1 724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Nízká: všechny fúze	1851	100,0 (1 851/1 851)	(99,8, 100,0)

¹ Všechna pozorování shromážděná z kombinací členů panelů a variant, pro které je většinové přiřazení negativní (fúze cílených variant s méně než 50 % pozitivních přiřazení).

² 95% oboustranný interval spolehlivosti (CI) vypočítaný Wilsonovou metodou hodnocení.

Tabulka 58 ukazuje analýzu složek rozptylu podpůrných čtení ze zhruba 36 pozorování v každé cílené fúzi. SD a %CV (celkově i pro každý zdroj) byly vypočítány a prezentovány pro každou cílenou fúzi.

Tabulka 58 TSO Comprehensive (EU) Analýza složek rozptylu podpůrných čtení rozboru u členů cílených panelů fúzí RNA

Úroveň varianty	Fúze	N	Střední hodnota podpůrných čtení	SD pracoviště (%CV)	SD operátora (%CV)	SD dne (%CV)	SD replikátu (%CV)	Celková SD (%CV)
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9)	3,37 (9)	6,93 (18)	9,04 (24)	12,39 (33)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41)	7,87 (23)	5,40 (16)	8,95 (27)	18,98 (57)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33)	3,50 (14)	4,20 (17)	4,86 (20)	10,86 (44)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31)	4,24 (12)	6,82 (19)	6,87 (19)	15,57 (43)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20)	10,20 (18)	9,25 (16)	8,69 (15)	19,93 (35)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5)	2,65 (8)	2,16 (7)	10,47 (32)	11,11 (34)
	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13)	4,09 (11)	6,17 (17)	5,20 (14)	10,17 (28)
	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22)	2,56 (8)	6,53 (20)	5,51 (16)	11,49 (34)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13)	0,00 (0)	2,74 (20)	4,37 (32)	5,47 (40)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17)	2,98 (18)	4,61 (27)	5,82 (34)	8,52 (50)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0)	3,41 (22)	3,83 (25)	4,39 (29)	6,75 (45)
	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13)	0,61 (5)	2,33 (17)	2,57 (19)	3,95 (29)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24)	3,46 (14)	0,00 (0)	6,39 (26)	9,44 (38)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,64 (37)	6,71 (37)
	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13)	1,03 (7)	0,00 (0)	5,11 (32)	5,61 (36)
	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12)	0,00 (0)	1,58 (10)	5,83 (35)	6,39 (39)

Studie 2

K vyhodnocení reprodukovatelnosti rozboru TSO Comprehensive (EU) byla provedena druhá studie na 3 testovacích pracovištích (2 externích a 1 interním), se zapojením 2 operátorů/přístrojů na každém pracovišti, s použitím 3 unikátních sad reagensií, ve 4 testovacích dnech (nejdoucích po sobě), při 2 bězích sekvenování na každou knihovnu vzorků.

Testování bylo prováděno pomocí vzorků DNA a RNA extrahovaných z 41 vzorků tkáně FFPE a 1 buněčné linie FFPE (1 vzorek tkáně FFPE a buněčná linie FFPE tvořily 2 členy panelu). Vzorky tkáně se skládaly z následujících typů: močový měchýř, kost, mozek, prs, tlusté střevo, tenké střevo, ledviny, játra, plíce, vaječník, prostata, kůže, měkká tkáň, žaludek, štítná žláza a děloha. Celkem bylo testováno 44 členů panelu včetně členů panelu s malými variantami DNA (SNV, MNV, inserce a delece), genovými amplifikacemi, různými skóre TMB, vysokými skóre MSI a členů panelu RNA s fúzemi a splice variantami. Většina členů panelu měla známé cílové varianty na úrovni cca 2krát až 3krát vyšší než mez detekce pro danou variantu (~2–3xLoD).

LoD je koncentrace analytu, kde pozorované výsledky rozboru jsou pozitivní (varianty detekované vzhledem k mezní hodnotě rozboru TSO Comprehensive (EU)) nejméně 95 % času. Střední pozorované úrovně varianty byly kategorizovány jako cca < 2xLoD (pozorované úrovně varianty < 1,5xLoD), ~2-3xLoD (pozorované úrovně varianty 1,5xLoD až 3,4xLoD) a cca > 3xLoD (pozorované úrovně varianty > 3,4xLoD).

PPC pro malé varianty DNA, genové amplifikace, varianty MSI-High a varianty RNA byly vypočítány kombinací pozorování ze všech běhů sekvenování a pracovišť. PNC byly podobně vypočítány pro malé varianty DNA, genové amplifikace varianty RNA. Pro každou známou cílenou variantu byla z jednotlivých pracovišť, operátorů/přístrojů, dnů, šarží reagensií a běhů sekvenování pro výpočet PNC zkombinována pozorování rozboru TSO Comprehensive (EU) u členů panelu stejného typu varianty, ale obsahujících další varianty neodvozené ze stejného zdrojového vzorku a nesplňující většinové pravidlo pro danou variantu (< 50 % přiřazení bylo pozitivních). 95% oboustranné intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočítány Wilsonovou metodou hodnocení.

Malé varianty DNA

Tabulka 59 ukazuje PPC pro cílené malé varianty DNA. PPC se pohybovala od 91,3 % u BRAF SNV až po 100 % u většiny malých variant DNA.

Tabulka 59 PPC rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci malých variant DNA u členů kombinovaného cíleného panelu

Pozorovaná úroveň varianty ¹	Typ varianty	Cílená varianta (nukleotid)	Cílená varianta (aminokyselina)	Střední hodnota VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
~2-3x LoD	DELECE	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2-3x LoD	DELECE	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2-3x LoD	INZERCE	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
~2-3x LoD	INZERCE	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	INZERCE	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2-3x LoD	DELECE	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	DELECE	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)

Pozorovaná úroveň varianty ¹	Typ varianty	Cílená varianta (nukleotid)	Cílená varianta (aminokyselina)	Střední hodnota VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
~2-3x LoD	INZERCE	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	INZERCE	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	DELECE	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INZERCE	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	INZERCE	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Úroveň varianty vypočítaná ze střední pozorované frekvence variantní alely.

² Střední hodnota frekvence variantní alely vypočítaná z pozorovaných výsledků rozboru.

³ 95% oboustranný interval spolehlivosti vypočítaný Wilsonovou metodou hodnocení.

PNC byla 100 % pro všechny malé varianty DNA.

Tabulka 60 ukazuje analýzu složek rozptylu výsledků VAF (frekvence variantní alely) pro každý zdroj rozptylu a celkový rozptyl u všech členů panelu s cílenými malými variantami DNA.

Tabulka 60 Analýza složek rozptylu VAF pro cílené malé varianty DNA

Cílená varianta (nukleotid)	N	Střední hodnota VAF	SD pracoviště (%CV)	SD operátora (pracoviště) (%CV)	SD dne (pracoviště, operátor) (%CV)	SD šarže (%CV)	SD běhu (%CV)	Celková SD (%CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	46	0,112	0,000 (0,0)	0,004 (3,8)	0,015 (13,7)	0,005 (4,1)	0,008 (6,9)	0,018 (16,3)
chr7_55259515_T_G	38	0,045	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,012 (27,3)	0,000 (0,0)	0,003 (6,8)	0,013 (28,8)
chr7_140453136_A_T	46	0,045	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,016 (34,9)	0,000 (0,0)	0,006 (12,2)	0,017 (36,9)
chr7_140453136_AC_TT	46	0,130	0,000 (0,0)	0,004 (2,9)	0,017 (13,4)	0,003 (2,6)	0,006 (4,9)	0,019 (14,8)
chr9_139399350_C_CG	48	0,146	0,015 (10,2)	0,000 (0,0)	0,012 (8,2)	0,000 (0,0)	0,004 (2,8)	0,020 (13,4)
chr10_89720798_GTACT_G	44	0,157	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,021 (13,6)	0,002 (1,6)	0,010 (6,4)	0,024 (15,3)
chr12_25398284_CC_AT	38	0,111	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (16,8)	0,003 (2,5)	0,008 (7,3)	0,020 (18,5)
chr17_7574002_CG_C	44	0,158	0,007 (4,2)	0,000 (0,0)	0,021 (13,5)	0,013 (8,6)	0,013 (8,2)	0,029 (18,4)
chr17_7574029_C_CGGAT	48	0,154	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (11,0)	0,006 (3,8)	0,010 (6,6)	0,021 (13,4)
chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	36	0,075	0,013 (16,9)	0,006 (8,1)	0,013 (16,7)	0,000 (0,0)	0,004 (4,7)	0,019 (25,5)
chr22_41574678_GC_G	44	0,245	0,006 (2,4)	0,002 (0,6)	0,019 (7,9)	0,000 (0,0)	0,005 (2,1)	0,021 (8,6)

Vyskytly se dvě cílené malé varianty DNA, pro něž byl počet pozorování příliš malý na to, aby bylo možné uplatnit model složek rozptylu. Pro tyto dvě cílené varianty byly celkové SD 0,027 pro variantu chr1_27024001_C_CG a 0,001 pro variantu chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Genové amplifikace

Tabulka 61 uvádí PPC pro cílené genové amplifikace. PPC byla pro MET 100,0 % a pro ERBB2 100,0 %.

Tabulka 61 PPC rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci genových amplifikací u členů kombinovaného cíleného panelu

Pozorovaná úroveň varianty ¹	Cílená varianta	Střední pozorovaná míra exprese ²	Procento pozitivních přiřazení (%)	95% CI ³
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Úroveň varianty vypočítaná ze střední pozorované míry exprese.

² Střední hodnota míry exprese vypočítaná z pozorovaných výsledků rozboru.

³ 95% oboustranný interval spolehlivosti vypočítaný Wilsonovou metodou hodnocení.

PNC byla pro všechny genové amplifikace 100 %.

Tabulka 62 ukazuje analýzu složek rozptylu výsledků míry exprese pro každý zdroj rozptylu a celkový rozptyl u všech členů panelu s cílenými genovými amplifikacemi.

Tabulka 62 Analýza složek rozptylu míry exprese pro cílené genové amplifikace

Cílená varianta	N	Střední hodnota míry exprese	SD pracoviště (%CV)	SD operátora (pracoviště) (%CV)	SD dne (pracoviště, operátor) (%CV)	SD šarže (%CV)	SD běhu (%CV)	Celková SD (%CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabulka 63 ukazuje PPC pro členy cíleného MSI-High panelu. PPC byla 100 % pro oba členy panelu MSI-High.

Tabulka 63 PPC rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci stavu MSI-H u členů kombinovaného cíleného panelu

Člen panelu	Střední hodnota skóre MSI ¹	N	Procento pozitivních přiřazení (%)	95% CI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
TPSBD6	55,7	32	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
Všichni členové		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Střední hodnota skóre MSI vypočítaná z pozorovaných výsledků rozboru.

² 95% oboustranný interval spolehlivosti vypočítaný Wilsonovou metodou hodnocení.

Tabulka 64 ukazuje analýzu složek rozptylu výsledků skóre MSI pro každý zdroj rozptylu a celkový rozptyl u všech členů panelu cíleného na stav MSI-High.

Tabulka 64 Analýza složek rozptylu skóre MSI pro členy panelu cíleného na MSI-High

Člen panelu	N	Střední hodnota skóre MSI	SD pracoviště (%CV)	SD operátora (pracoviště) (%CV)	SD dne (pracoviště, operátor) (%CV)	SD šarže (%CV)	SD běhu (%CV)	Celková SD (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

K posouzení reprodukovatelnosti skóre TMB byla provedena kvantitativní analýza skóre na členech cíleného panelu TMB, kteří představují škálu očekávaných skóre TMB. **Tabulka 65** ukazuje výsledky analýzy složek rozptylu skóre TMB pro každý zdroj rozptylu a celkový rozptyl u všech členů cíleného panelu TMB. Celkové SD skóre TMB byly 1,0 (%CV = 13) pro jednoho člena panelu (střední hodnota skóre TMB = 7,6) a 1,1 (%CV = 2) pro jiného člena panelu (střední hodnota skóre TMB = 63,2).

Tabulka 65 Analýza složek rozptylu skóre TMB pro členy panelu cíleného na TMB

Člen panelu*	N	Střední hodnota skóre TMB	SD pracoviště (%CV)	SD operátora (pracoviště) (%CV)	SD dne (pracoviště, operátor) (%CV)	SD šarže (%CV)	SD běhu (%CV)	Celková SD (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

* Vyskytl se 1 člen panelu TMB, pro kterého byl počet pozorování příliš malý (N = 2) na to, aby bylo možné uplatnit model složek rozptylu. Pro tohoto člena panelu byla celková SD 1,7.

Varianty RNA

[Tabulka 66](#) ukazuje PPC pro cílené varianty RNA. PPC se pohybovala od 91,7 % u KIF5B-RET až po 100 % pro většinu variant RNA.

Tabulka 66 PPC rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci variant RNA u členů kombinovaného cíleného panelu

Pozorovaná úroveň varianty ¹	Typ varianty	Cílená varianta	Střední hodnota podpůrných čtení ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
> 3x LoD	Fúze	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúze	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúze	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúze	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúze	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúze	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúze	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3x LoD	Fúze	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúze	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúze	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúze	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúze	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúze	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúze	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	Fúze	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
	Fúze	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
> 3x LoD	Fúze	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3x LoD	Splice varianta	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3x LoD	Splice varianta	Přeskočení MET exon 14	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Úroveň varianty vypočítaná ze střední pozorované hodnoty podpůrných čtení.² Střední hodnota podpůrných čtení vypočítaná z pozorovaných výsledků rozboru.³ 95% oboustranný interval spolehlivosti vypočítaný Wilsonovou metodou hodnocení.

PNC bylo 100 % pro každou cílenou variantu RNA, kromě fúze FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60 % (984/988; 95% CI: 98,96 % až 99,84 %).

Tabulka 67 ukazuje analýzu složek rozptylu výsledků podpůrných čtení pro každý zdroj rozptylu a celkový rozptyl u všech členů panelu s cílenými variantami RNA.

Tabulka 67 Analýza složek rozptylu podpůrných čtení pro cílené varianty RNA

Cílená varianta	N	Střední hodnota podpůrných čtení	SD pracoviště (%CV)	SD operátora (pracoviště) (%CV)	SD dne (pracoviště, operátor) (%CV)	SD šarže (%CV)	SD běhu (%CV)	Celková SD (%CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GPOC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
Splice varianta EGFR VIII	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Splice varianta s přeskočením MET exon 14	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Přesnost v rámci laboratoře

K posouzení konzistence výsledků v rámci laboratoře pro TSO Comprehensive (EU) byly provedeny dvě studie. Studie 1 hodnotila fúze NTRK a RET a malé varianty DNA a RET. Studie 2 hodnotila TMB a MSI.

Studie 1

Konzistence výsledků v rámci laboratoře byla hodnocena pro fúze NTRK1–3 (gliom nízkého stupně, multifonní glioblastom, myofibroblastický sarkom, sekreční karcinom prsu), fúze RET (karcinom štítné žlázy a kožní problémy způsobené neznámým karcinomem) a malé varianty DNA RET (medulární karcinom štítné žlázy) pomocí tkání FFPE s indikovanými karcinomy. Každý vzorek byl testován na dvou úrovních variant: ~1x LoD (nízká úroveň varianty) a ~2–3x LoD (vysoká úroveň varianty) s výjimkou vzorků CCDC6-RET, které byly testovány jen na nízké úrovni varianty. Každý vzorek na každé úrovni testování byl prováděn duplicitně v každé události přípravy knihovny třemi (3) operátory. Každý operátor zahájil přípravu knihovny ve třech (3)

počátečních dnech nejdoucích po sobě a sekvenoval na třech (3) určených přístrojích NextSeq 550Dx. Tři (3) šarže reagensů byly testovány vygenerováním 54 pozorování pro každou úroveň. Některé úrovně měly méně než 54 pozorování kvůli neplatným knihovnám.

Kvalitativní analýza

Kvalitativní shoda přiřazení variant byla vyhodnocena samostatně pro dvě úrovně variant pro danou variantu ze sloučených pozorování v rámci všech proměnných (operátoři, šarže reagensů, přístroje, dny a replikáty). PPC a PNC a přidružený oboustranný 95% interval spolehlivosti (Wilsonovo hodnocení) jsou shrnuty v [Tabulka 68](#) (malé varianty DNA) a [Tabulka 69](#) (fúze RNA).

Na vysoké úrovni varianty (~2–3x LoD) prokázal rozbor TSO Comprehensive (EU) 100 % pro PPC a PNC u všech testovaných variant.

Na nízké úrovni varianty (~1x LoD) se PPC pro malé varianty DNA pohybovalo od 83,3 % do 98,1 % a PPC pro fúze RNA od 90,7 % do 100 %. U variant s PPC < 95 % byly střední hodnoty VAF (RET C634Y a RET D898_E901del) nebo podpůrných čtení (NCOA4-RET a BCAN-NTRK1) pod příslušnou mezí detekce. Na nízké úrovni varianty bylo u všech variant dosaženo 100 % PNC.

Tabulka 68 Kvalitativní výsledky pro cílené varianty DNA

Úroveň varianty	Varianta	Typ varianty	Střední hodnota VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3, 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	DELECE	0,048	87,0 (47/54) (75,6, 93,6)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET C618R	SNV	0,045	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RETM918T	SNV	0,042	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	100,0 (216/216) (98,3, 100,0)
	RET D631_L633delinsE*	DELECE	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Úroveň varianty	Varianta	Typ varianty	Střední hodnota VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_E901del	DELECE	0,088	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET C618R	SNV	0,146	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET M918	SNV	0,078	100,0 (52/52) (93,1, 100,0)	100,0 (194/194) (98,1, 100,0)
	RET D631_L633delinsE*	DELECE	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Změny nukleotidů jsou v části Mez detekce uvedeny pro každou variantu kromě RET D631_L633delinsE, což je chromozom 10, pozice 43609940, reference ACGAGCT, alternativa A.

Tabulka 69 Kvalitativní výsledky pro cílené fúze RNA

Úroveň varianty	Fúze	Střední hodnota podpůrných čtení	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (buněčná linie FFPE)	23,1	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	
	KANK1-NTRK3	13,5	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	NCOA4-RET	13,3	90,7 (49/54) (80,1, 96,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	CCDC6-RET	18,7	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorek 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorek 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Úroveň varianty	Fúze	Střední hodnota podpůrných čtení	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~2-3x LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (buněčná linie FFPE)	28,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	
	KANK1-NTRK3	39,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	NCOA4-RET	24,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	CCDC6-RET	Není k dispozici	Netestováno	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorek 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorek 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kvantitativní analýza

Pro vyhodnocení celkové odchylky základní spojitě proměnné (VAF pro malé varianty DNA a podpůrná čtení pro fúze RNA) a odhad složek konzistence výsledků [směrodatná odchylka (SD), variační koeficient (CV)] byla pro každý zdroj rozptylu [operátoři, přístroje, dny, šarže reagentů, zbytková a celková hodnota] provedena analýza složek rozptylu s omezenou maximální pravděpodobností (REML). Výsledky uvádí [Tabulka 70](#) pro malé varianty DNA a [Tabulka 71](#) pro fúze RNA.

Odchyly VAF se zvyšují se střední hodnotou očekávanou pro binomický podíl. Odchyly podpůrných čtení se zvyšují se střední hodnotou očekávanou pro počítaná data. Zbytková složka byla největším přispěvatelem k celkovému rozptylu jak u malých variant DNA, tak u fúzí RNA na obou úrovních, což podporuje závěr, že detekce těchto variant rozbořením TSO Comprehensive (EU) je odolná vůči vlivům operátorů, šarží, přístrojů a dnů.

Tabulka 70 Kvantitativní výsledky SD a CV pro cílené malé varianty DNA

Úroveň VAF	Varianta	Typ varianty	Platné pokusy N	Střední hodnota VAF	SD operátora (%CV)	SD přístroje (%CV)	SD šarže (%CV)	SD dne (%CV)	Zbytková SD (%CV)	Celková SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELECE	54	0,048	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (8,7)	0,014 (30,0)	0,015 (31,2)
	RET C618R	SNV	54	0,046	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,014 (31,3)	0,014 (31,3)
	RET M918T	SNV	53	0,042	0,000 (0,0)	0,001 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (25,6)	0,011 (25,7)
	RET C634Y	MNV	54	0,028	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (3,3)	0,000 (0,0)	0,009 (30,7)	0,009 (30,9)
	RET D631_L633delinsE	DELECE	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
~3x LoD	RET D898_E901del	DELECE	54	0,088	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (1,4)	0,006 (7,0)	0,017 (19,2)	0,018 (20,5)
	RET C618R	SNV	54	0,146	0,003 (1,7)	0,000 (0,0)	0,020 (13,7)	0,002 (1,1)	0,018 (12,6)	0,027 (18,7)
	RET M918T	SNV	52	0,078	0,002 (3,1)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (9,1)	0,018 (23,1)	0,020 (25,0)
	RET C634Y	MNV	54	0,095	0,000 (0,0)	0,002 (2,5)	0,002 (2,1)	0,000 (0,0)	0,014 (15,0)	0,015 (15,3)
	RET D631_L633delinsE	DELECE	52	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

Tabulka 71 Kvantitativní výsledky SD a CV pro cílené fúze RNA

Úroveň podpůrných čtení	Fúze	Platné pokusy N	Střední hodnota podpůrných čtení	SD operátora (%CV)	SD přístroje (%CV)	SD šarže (%CV)	SD dne (%CV)	Zbytková SD (%CV)	Celková SD (%CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (buněčná linie)	54	23,1	4,55 (20)	1,18 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,73 (29)	8,21 (36)
	KANK1-NTRK3	54	13,5	0,74 (5)	0,11 (1)	1,09 (8)	0,00 (0)	4,22 (31)	4,42 (33)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,67 (13)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,67 (13)	5,09 (38)	5,61 (42)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,00 (0)	1,14 (6)	5,44 (29)	0,00 (0)	6,17 (33)	8,30 (44)
	KIF5B-RET (vzorek 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (vzorek 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)
2-3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (buněčná linie)	54	28,3	7,93 (28)	1,02 (4)	0,00 (0)	0,00 (0)	9,05 (32)	12,08 (43)
	KANK1-NTRK3	54	39,2	5,10 (13)	0,00 (0)	4,78 (12)	0,00 (0)	9,44 (24)	11,74 (30)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,05 (12)	0,00 (0)	5,92 (24)	0,00 (0)	6,78 (27)	9,50 (38)
	KIF5B-RET (vzorek 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (vzorek 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Studie 2

Konzistence výsledků v rámci laboratoře byla hodnocena pro TMB a MSI. K vyhodnocení konzistence výsledků na různých úrovních v celém rozsahu skóre bylo použito pět vzorků DNA NSCLC FFPE pro TMB a sedm vzorků CRC FFPE pro MSI, včetně MSS i MSI-High. Každý vzorek byl zpracováván duplicitně třemi (3) operátory ve třech (3) dnech s třemi (3) přípravami knihovny pro tři (3) šarže reagentů pomocí tří přístrojů NextSeq 550Dx generujících 54 pozorování na každé úrovni.

Pro stav MSI byla vyhodnocena kvalitativní shoda. Rozbor TSO Comprehensive (EU) prokázal 100% shodu u procenta pozitivních přiřazení a procenta negativních přiřazení stavu MSI. Pro TMB vykazuje rozbor TSO Comprehensive (EU) skóre TMB; kvalitativní shodu nelze použít.

Celkové odchylky skóre TMB a MSI, spolu s příspěvkem podle zdroje (přístroje, operátoři, šarže, dny a zbytek), byly kvantifikovány pomocí modelu složek rozptylu v celém rozsahu skóre. Směrodatnou odchylku (SD) a variační koeficient (CV) uvádí [Tabulka 72](#) pro TMB a [Tabulka 73](#) pro MSI podle úrovně. Některé úrovně měly méně než 54 pozorování kvůli neplatným knihovnám.

Tabulka 72 Kvantitativní výsledky SD a CV pro skóre TMB

Úroveň	Střední hodnota skóre TMB	Platné pokusy N	SD operátora (%CV)	SD přístroje (%CV)	SD šarže (%CV)	SD dne (%CV)	Zbytková SD (%CV)	Celková SD (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Tabulka 73 Kvantitativní výsledky SD a CV pro skóre MSI

Stav MSI	Úroveň	Střední hodnota skóre MSI (%)	Platné pokusy N	SD operátora (%CV)	SD přístroje (%CV)	SD šarže (%CV)	SD dne (%CV)	Zbytková SD (%CV)	Celková SD (%CV)
MS-Stable	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-High	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

Odchylky skóre TMB mají tendenci se zvyšovat se střední hodnotou očekávanou u teoretického rozložení počítaných dat. Odchylky skóre MSI pro úrovně poblíž skóre MSI = 50 jsou větší než odchylky skóre MSI blíže 0 nebo 100 v souladu s variabilitou teoretického rozložení proporčních dat. Zbytková složka byla největším příspěvatelem k celkovému rozptylu jak u skóre MSI, tak u skóre TMB, což podporuje závěr, že skóre jsou odolná vůči vlivům operátorů, šarží, přístrojů a dnů. MSI i TMB jsou však komplexní biomarkery a analytická účinnost se může vzorek od vzorku lišit. To znamená, že odchylky TMB nezávisí jen na hodnotě TMB, ale i na složení variant ve vzorku, například typu varianty (SNV, Indel) a úrovně VAF (blízkost mezní hodnoty pro zařazení). Podobně variace MSI nezávisí jen na hodnotě MSI, ale i na složení míst ve vzorku, například počtu nestabilních míst a množství nestability na každé místo.

Hodnoty C5 a C95 kolem mezní hodnoty 20,00 % byly určeny pro MSI pomocí profilu konzistence dat ([Tabulka 74](#)).

Tabulka 74 Interval C5–C95 pro MSI

Skóre	C5	C95
MSI	17,17 %	23,32 %

Byl vyhodnocen vliv obsahu nádoru na skóre TMB a MSI. U většiny vzorků měl obsah nádoru $\geq 30\%$ zanedbatelný vliv na skóre TMB nad cca 10 mutacemi megabázi. Skóre TMB zůstávala se zvyšujícím se obsahem nádoru relativně beze změny. Pro MSI-High vzorky vykázal obsah nádoru pozitivní lineární korelaci se skóre MSI. MSI-High vzorky v průměru zůstaly MSI-High, když byl obsah nádoru $\geq 30\%$. Endometriální vzorky se chovaly zřetelně odlišně od ostatních typů tkání a ukázalo se, že potřebují větší množství obsahu nádoru, aby je bylo možno nazvat MSI-High.

Přesnost profilování nádorů

Detekce variant rozbořem TSO Comprehensive (EU) byla porovnána s výsledky referenčních metod. Malé varianty DNA a TMB byly porovnány s externí validovanou metodou NGS celého exomu. Genové amplifikace byly porovnány s metodou NGS stejného celého exomu nebo pro amplifikace HER2 validovány podle metody duální in situ hybridizace (DISH). MSI byla vyhodnocena podle validovaného testu MSI-PCR. Splice varianty RNA byly porovnány s validovanou metodou kvantitativního PCR (qPCR). Fúze ROS1 a ALK byly porovnány s validovanými rozbořy FISH. Všechny ostatní fúze byly porovnány s kompozitní metodou skládající se z validovaného rozboru NGS celého exomu RNA (RNGS1), cíleného panelu fúzí NGS (RNGS2) a droplet digitálního PCR (ddPCR).

Detekce malých variant DNA

Výsledky detekce malých variant DNA rozbořem TSO Comprehensive (EU) byly porovnány s výsledky sekvenování celého exomu (WES), které využívá WES s vyváženými páry nádorových a normálních vzorků pro přiřazení germinálních a somatických malých variant. Porovnání mezi malými variantami, tvořenými jednonukleotidovými variantami (SNV), inzercemi a delecemi, bylo založeno na 124 vzorcích ze 14 různých typů tkání, které byly platné pro TSO Comprehensive (EU) i WES. TSO Comprehensive (EU) na rozdíl od rozboru WES dokáže detekovat vícenukleotidové varianty (MNV, 2–3 bp), což vyžaduje fázování. TSO Comprehensive (EU) MNV byly ve WES hodnoceny jako jednotlivé SNV. Přehled shody na úrovni variant včetně procenta pozitivní shody (PPA) a procenta negativní shody (NPA) pro všechna přiřazení variant uvádí [Tabulka 75](#).

Tabulka 75 Přehled shody pro přiřazení malých variant hodnocených podle germinálního nebo somatického stavu

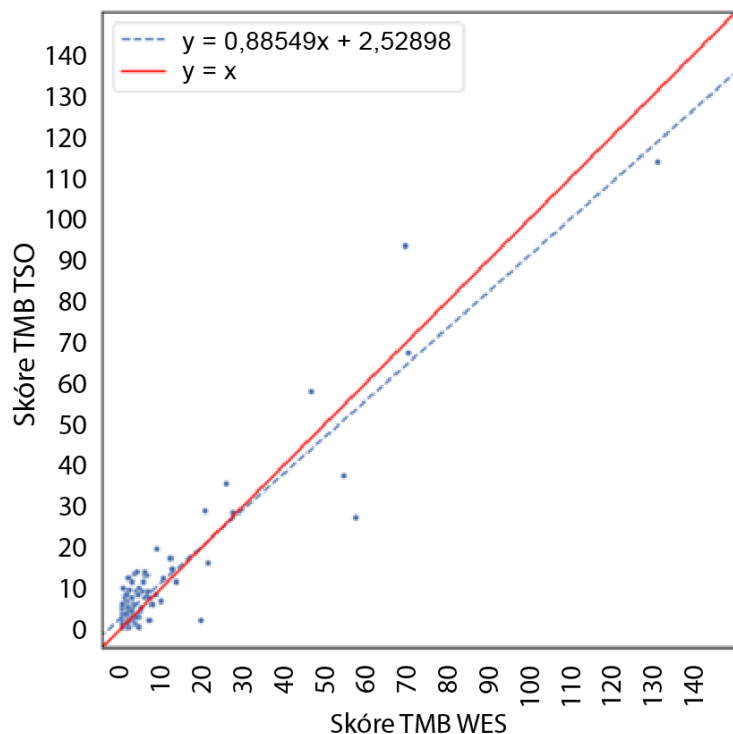
	Somatické přiřazené WES	WES Germline Called	Nepřiřazené WES
Přiřazeno TSO Comprehensive (EU)	382	33 163	426
Nepřiřazeno TSO Comprehensive (EU)	69	61	70 000 481
Celkem	451	33 224	70 000 907
Procentní shoda	PPA: 85 % (382/451), 95% CI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33 163/33 224) 95% CI: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70 000 481/70 000 907) 95% CI: [99,999 %, 99,999 %]

Celkem bylo TSO Comprehensive (EU) přiřazeno 426 variant, které metodou WES nebyly detekovány. 204 (48 %) z těchto variant mělo frekvence variantní alely pod prahem pro přiřazení metodou WES. U zbývajících potenciálně falešně pozitivních variant byl důkaz o přiřazení variant metodou WES s malou průkazností. Také měla řada variant velmi nízkou průkaznost WES v porovnávaných normálních vzorcích. Tento výsledek naznačuje, že tyto varianty nebyly metodou WES v nádoru zachyceny kvůli kontaminaci normálního vzorku nádorem.

Detekce nádorové mutační zátěže

Shoda u TMB byla zjištěna porovnáním skóre TMB (somatické mutace / megabáze) z metody WES a rozboru TSO Comprehensive (EU) u 124 vzorků s dostupnými daty z TSO Comprehensive (EU) i WES. Lineární regresní analýza s WES jako prediktorem má průsečík y 2,53, sklon 0,89 a Pearsonův korelační koeficient 0,94 ([Obrázek 3](#)).

Obrázek 3 Korelace skóre TMB mezi WES a TSO Comprehensive (EU)



Detekce genových amplifikací

Detekce genových amplifikací rozbořem TSO Comprehensive (EU) byla porovnána s výsledky stejného rozboru WES používajícího buď vyvážené nádorové a normální vzorky, nebo čistě nádorové vzorky. Celkem se jednalo o 420 vzorků, z nichž 183 využívalo ortogonální metodu nádorových a normálních vzorků a 237 jen nádorové vzorky. Ze těchto 420 vzorků bylo pro studii vybráno 50 vzorků, protože byly pozitivní na amplifikaci pomocí TSO Comprehensive (EU) nebo předchozího rozboru. Výkon těchto charakterizovaných vzorků byl upraven pomocí průměrné prevalence fúze. Kombinovaný výkon u charakterizovaných a necharakterizovaných vzorků byl vypočítán pomocí váženého průměru s inverzní variancí. Vzorky pocházely ze 14 typů tkání a obsahovaly amplifikace 55 genů. TSO Comprehensive (EU) uvádí amplifikace genů MET a ERBB2. Přesnost však byla hodnocena pro všech 55 genů. Přehled genových amplifikací uvádí [Tabulka 76](#).

Tabulka 76 Přehled shod pro genové amplifikace

PPA (95% CI*)	NPA (95% CI*)
88,80 % (84,61, 92,43)	99,02 % (98,93, 99,12)

* Interval spolehlivosti vypočtený metodou bootstrap.

Amplifikace ERBB2 (HER2) v žaludeční a prsní tkáni byly analyzovány odděleně od ostatních genových amplifikací pomocí metody duální in situ hybridizace (DISH). Celkem bylo testováno 116 vzorků prsní a žaludeční tkáně, z nichž 64 bylo předtím charakterizováno jako pozitivní na HER2 metodou IHC nebo FISH. Jeden vzorek se nepodařilo extrahovat, 4 vzorky nebyly platné pro TSO Comprehensive (EU) a 3 vzorky nebyly platné pro rozbor DISH. Ze 108 vzorků mělo 20 (18,5 %) hraniční skóre (od 1,5 do 2,5) v blízkosti mezní hodnoty pro DISH, což je 2,0. Výsledky shody včetně PPA a NPA pro všechny vzorky a případy vyřazených HER2 na základě hraniční hodnoty metody DISH jsou uvedeny v [Tabulka 77](#).

Tabulka 77 Přehled shod mezi TSO Comprehensive a HER2 DISH včetně genových amplifikací HER2

Genové amplifikace HER2 Všechny (prsní a žaludeční)	HER2 DISH amplifikované	HER2 DISH neamplifikované
Pozitivní TSO Comprehensive (EU)	17 (vč. 1 hraniční)	13 (vč. 1 hraniční)
Negativní TSO Comprehensive (EU)	10 (vč. 6 hraničních)	68 (vč. 12 hraničních)
Procentní shoda včetně hraničních případů	PPA: 63 % (17/27) 95% CI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95% CI: [74 %, 90 %]
Procento shody bez hraničních případů	PPA: 80 % (16/20) 95% CI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95% CI: [72 %, 90 %]

Detekce mikrosatelitové nestability

Detekce mikrosatelitové nestability rozbořem TSO Comprehensive (EU) byla porovnána s výsledky validovaného testu MSI-PCR, který pro testování používá vyvážené nádorové a normální vzorky. Celkem bylo porovnáno 195 vzorků splňujících požadavek na obsahu nádoru ≥ 30 % (pro stav MS-Stable) a reprezentujících 14 typů tkání. MSI-PCR hodnotí 5 míst a má 3 výsledky – MSI-Stable (žádná nestabilní místa), MSI-Low (jedno nestabilní místo) a MSI-High (MS-H) (dvě nebo více nestabilních míst). TSO Comprehensive (EU) hodnotí až 130 mikrosatelitových míst a klasifikuje vzorky pouze jako MSI-Stable nebo MSI-High (≥ 20 % nestabilních míst). Výsledky MSI-Low byly seskupeny s výsledky MSI-Stable u MSI-PCR. Analýzu shody uvádí [Tabulka 78](#).

Tabulka 78 Přehled analýzy shody mezi TSO Comprehensive (EU) a MSI-PCR pro mikrosatelitovou nestabilitu DNA

Stav MSI	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSI-Stable
TSO Comprehensive (EU) Nestabilní (MSI-High)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabilní (MS-Stable)	3	0	150
Celkem	44	2	150
Procentní shoda	PPA: 93 % (41/44) 95% CI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95% CI: [95 %, > 99 %]	

Detekce splice variant RNA

Přesnost detekce splice variant byla vypočítána porovnáním výsledků TSO Comprehensive (EU) s rozboru qPCR pro EGFRvIII a přeskočení MET exon 14 včetně jedné známé pozitivní RNA pro každou splice variantu. Analýza shody byla provedena na celkem 230 unikátních FFPE vzorcích RNA ze 14 typů tkání s dostupnými daty z rozboru TSO Comprehensive (EU) i z referenční metody. Všechny vzorky byly testovány na přeskočení MET exon 14, zatímco EGFRvIII byla testována pouze v mozkových tkáních. Tři vzorky, které byly podle qPCR označeny jako pozitivní na přeskočení MET exon 14, ale ne podle TSO Comprehensive (EU), měly průměrnou Ct > 37 a byly pod mezí detekce TSO Comprehensive (EU). [Tabulka 79](#) obsahuje souhrn shodných výsledků studie.

Tabulka 79 Přehled analýzy shody mezi TSO Comprehensive (EU) a qPCR pro splice varianty RNA

Splice varianty RNA	Pozitivní v qPCR	Negativní v qPCR
Pozitivní TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	3	0
Negativní TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	0	13
Pozitivní TSO Comprehensive (EU) (Přeskočení MET exon 14)	1	0
Negativní TSO Comprehensive (EU) (Přeskočení MET exon 14)	3	217
Celkem	7	230
Procentní shoda	PPA: 57 % (4/7) 95% CI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95% CI: [98 %, 100 %]

Detekce fúzí RNA

Porovnání s kompozitní metodou

Fúze TSO Comprehensive (EU) byly porovnány s kompozitní metodou skládající se ze sekvenování celého exomu RNA pomocí panelu NGS (RNGS1), cíleného panelu fúzí NGS (RNGS2) a droplet digitálního PCR (ddPCR).

Metoda RNGS1 překrývá všechny geny, pro které TSO Comprehensive (EU) umí zjistit fúze. Mez detekce metody RNGS1 však byla oproti TSO Comprehensive (EU) 4–8× vyšší vzhledem k počtu podpůrných čtení pozorovaných v překrývajících se přiřazeních fúzí. Proto byla použita kompozitní metoda používající dvě další metody s větší citlivostí, ale menší šířkou u fúzí, společně s metodou WES (sekvenování celého exomu) (RNGS1).

Celkem bylo testováno 255 unikátních vzorků RNA reprezentujících 14 typů tkání a vyhovujících metrikám TSO Comprehensive (EU) metodou RNGS1. Dva vzorky byly pro kontrolu kvality vzorku metodou RNGS1 neplatné a byly z další analýzy vyřazeny. Z 82 fúzí přiřazených testem TSO Comprehensive (EU) byly 4 vyřazeny z hodnocení vzhledem k selháním kontroly kvality vzorků metodou RNGS1 a 7 dalších fúzí nešlo přiřadit kvůli absenci cílů v panelu RNGS1. Ze zbývajících 71 fúzí přiřazených testem TSO Comprehensive (EU) bylo 9 fúzí metodou RNGS1 potvrzeno. Metoda RNGS1 přiřadila 4 fúze, které nebyly přiřazeny testem TSO Comprehensive (EU).

Z 62 fúzí, které byly u TSO Comprehensive (EU) pozitivní a nebyly detekovány metodou RNGS1, se 13 překrývalo a bylo potvrzeno metodou RNGS2. Jedna fúze byla přiřazena metodou RNGS2, ale ne testem TSO Comprehensive (EU).

Na fúze přiřazené testem TSO Comprehensive (EU), nepřiřazené nebo nepřiřaditelné metodou RNGS1 a nevyhodnocené metodou RNGS2 (49) bylo potom použito droplet digitální PCR. Dále bylo ddPCR použito k opětovnému vyhodnocení 2 ze 4 fúzí, které byly u TSO Comprehensive (EU) podle metody RNGS1 falešně negativní, a 2 z 9 shodujících se fúzí TSO Comprehensive (EU) a RNGS1. Do testování každého vzorku pozitivních fúzí bylo pro zajištění specifity zařazeno pět vzorků negativních na fúze. Osmnáct fúzí nebylo testováno pomocí ddPCR kvůli nemožnosti navrhnout primery/sondy, více genových partnerů pro fúzi nebo nedostatek zbývajících materiálu FFPE. Primery a sondy byly u ddPCR navrženy podle sledovaných bodů zlomu v rozboru TSO Comprehensive (EU).

Celkem bylo metodou ddPCR detekováno 52 fúzí, z nichž 41 fúzí bylo přiřazeno TSO Comprehensive (EU), ale nebylo nebo nemohlo být přiřazeno metodou RNGS1. Devět fúzí bylo přiřazeno metodou ddPCR, ale bylo negativních v TSO Comprehensive (EU) nebo RNGS1. Dvě fúze pozitivní v ddPCR potvrdily 2 shodující se fúze TSO Comprehensive (EU) a RNGS1. Ze dvou opětovně hodnocených vzorků, určených metodou RNGS1 jako falešně negativní u TSO Comprehensive (EU), nebyla metodou ddPCR detekována žádná fúze; byly však započítány jako falešně negativní na základě porovnání RNGS1.

Z těchto 255 vzorků bylo pro studii vybráno 35 vzorků, protože byly pozitivní na fúzi při použití TSO Comprehensive (EU) nebo předchozího rozboru. Výkon těchto charakterizovaných vzorků byl upraven pomocí průměrné prevalence fúze. Kombinovaný výkon u charakterizovaných a necharakterizovaných vzorků byl vypočítán pomocí váženého průměru s inverzní variancí. Kompozitní metody shodných výsledků pro fúze uvádí [Tabulka 80](#).

66 fúzí (54 jedinečných fúzí) shodných s kompozitní metodou představovalo 43 genů v panelu TSO Comprehensive (EU). Fúze však mohou být vykázaný pouze z 23 genů uvedených v [Tabulka 80](#).

Tabulka 80 Přehled shod pro RNA fúze

PPA (95% CI*)	NPA (95% CI*)
80,38 % (64,20, 92,32)	99,96 % (99,94, 99,98)

* Interval spolehlivosti vypočtený metodou bootstrap.

Porovnání s metodou FISH pro fúze ROS1 a ALK

Dvacet pět vzorků NSCLC bylo otestováno metodou FISH na fúze ROS1 a ALK a dalších 5 vzorků NSCLC bylo otestováno na fúze ROS1. U osmi vzorků se test na ROS1 metodou FISH nepodařil vzhledem k nedostatku tkáně. Dvě fúze ROS1 a jedna fúze ALK byly detekovány jak testem TSO Comprehensive (EU), tak metodou FISH. Nebyly pozorovány žádné neshodné výsledky. [Tabulka 81](#) obsahuje souhrn shodných výsledků TSO Comprehensive (EU) a metody FISH pro fúze ROS1 a ALK.

Tabulka 81 Souhrn shodných výsledků TSO Comprehensive (EU) a metody FISH pro fúze ROS1 a ALK

ALK+ROS1	Pozitivní ve FISH	Negativní ve FISH
Pozitivní TSO Comprehensive (EU)	3	0
Negativní TSO Comprehensive (EU)	0	44
Celkem	3	44
Procentní shoda	PPA: 100 % (3/3) 95% CI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95% CI: [92 %, 100 %]

Platnost vzorku

Platnost vzorku (při prvním pokusu) byla změřena pro 181 unikátních vzorků RNA a 272 unikátních vzorků DNA z FFPE bloků o stáří ≤ 5 let. Tyto vzorky byly vybrány na základě typu tkáně a dostupného materiálu; platnost rozboru nebyla známá. Aby byl typ varianty pokládán za platný, musí být splněny metriky kontroly kvality knihovny. Platnost vzorku byla hodnocena samostatně pro každý typ varianty (malé varianty DNA / TMB, MSI, genové amplifikace, fúze / splice varianty) a uvádí ji [Tabulka 82](#). Předpokládá se další snížení platnosti MSI o 1 % u FFPE bloků o stáří ≤ 2 roky z důvodu přepravy reagentů.

Tabulka 82 Platnost vzorku

Typ varianty	Platnost vzorku
Fúze / splice varianty (RNA)	76 %
Malé varianty DNA / TMB	75%
MSI	72 %
Genové amplifikace	94 %

Přehled analytické validace pro tvrzení týkajících se profilování nádorů

Na základě údajů o mezi detekce, konzistenci výsledků, reprodukovatelnosti a přesnosti je rozbor TSO Comprehensive (EU) analyticky validován pro:

- Malé varianty DNA – SNV, MNV, inserce a delece.
- TMB
- MSI
- Genové amplifikace MET a ERBB2 (HER2) (viz [Tabulka 2](#)).
- 23 genů, pro které mohou být detekovány fúze (viz [Tabulka 2](#)).
- Splice varianty EGFR a MET (viz [Tabulka 2](#)).

Klinická účinnost NTRK

K ověření rozboru TSO Comprehensive (EU) jako doprovodné diagnostiky (CDx) pro výběr pacientů pro léčbu přípravkem VITRAKVI (larotrectinib) byly vzorky od pacientů zařazených do klinických studií s larotrectinibem (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; souhrnně označované jako vzorky ze studií s larotrectinibem) s datovou uzávěrkou 15. července 2019, doplněné o komerčně získané vzorky tkáně FFPE, testovány na podporu studie přesnosti a klinické překlenovací studie rozboru TSO Comprehensive (EU).

NCT02122913 byla multicentrická, otevřená studie fáze 1 s navyšováním dávky u dospělých pacientů s pokročilými solidními nádory (všichni zájemci), kteří nebyli vybráni z důvodu positivity fúze NTRK. Po ukončení části studie zaměřené na zvyšování dávky byla zahájena část, ve které se podávání přípravku rozšířilo na pacienty s prokázanou pozitivitou fúze NTRK a na pacienty, u nichž se výzkumný pracovník domníval, že by z vysoce selektivního inhibitoru TRK mohli mít prospěch. NAVIGATE NCT02576431 je probíhající multicentrická, otevřená studie fáze 2 pro pacienty ve věku 12 let a starších s recidivujícími pokročilými solidními nádory s prokázanou fúzí NTRK podle hodnocení externí laboratoře. SCOUT NCT02637687 je probíhající multicentrická otevřená studie fáze 1/2 pro dětské pacienty ve věku od narození do 21 let s pokročilými solidními nebo primárními nádory centrálního nervového systému (CNS).

Z pacientů s pozitivitou fúze NTRK zahrnutých do studie rozboru TSO Comprehensive (EU) tvořilo 164 pacientů rozšířený soubor primární účinnosti larotrectinibu (ePAS4).

Studie přesnosti pro detekci fúzí NTRK1, NTRK2 a NTRK3

Přesnost rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci fúzí NTRK (NTRK1, NTRK2 nebo NTRK3) u pacientů se solidními nádory byla prokázána posouzením shody výsledků fúzí NTRK mezi rozbohem TSO Comprehensive (EU) a validovanou ortogonální metodou založenou na NGS.

Byla provedena retrospektivní neintervenční studie. Zkušební vzorky larotrektribu a doplňkové vzorky byly testovány pomocí rozboru TSO Comprehensive (EU) na jednom externím pracovišti a pomocí ortogonální metody v centrální laboratoři. Byla odhadnuta přesnost přiřazení fúzí NTRK rozbořem TSO Comprehensive (EU) ve srovnání s ortogonální metodou. Bylo vypočteno procento pozitivní shody (PPA), procento negativní shody (NPA) a odpovídající oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI).

Bylo testováno 516 vzorků pomocí rozboru TSO Comprehensive (EU) nebo ortogonální metodou. Z těchto vzorků bylo 499 testováno oběma metodami. Sedmnáct z 516 vzorků nebylo testováno jedním z testů z důvodu neúspěšné extrakce, neznámého důvodu (u ortogonální metody) nebo odchylky od protokolu. Ze 499 vzorků testovaných oběma metodami bylo 170 (34,1 %) zkušebních vzorků larotrektribu a 329 (65,9 %) doplňkových vzorků.

Křížovou tabulku výsledků pro 499 vzorků uvádí [Tabulka 83](#). Ze 499 vzorků mělo 85 vzorků neplatné výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU); z těchto 85 mělo 53 také neplatné výsledky ortogonální metody. Dalšíh sedm vzorků mělo neplatné výsledky získané ortogonální metodou. 407 ze 499 vzorků tak mělo platné výsledky získané oběma metodami.

Tabulka 83 Studie přesnosti NTRK: Křížová tabulka výsledku získaného rozbořem TSO Comprehensive (EU) ve srovnání s výsledkem získaným ortogonální metodou pro detekci fúzí NTRK

Výsledek rozboru TSO Comprehensive (EU)	Výsledek získaný ortogonální metodou			
	Fúze NTRK pozitivní	Fúze NTRK negativní	Neplatné	Celkem
Fúze NTRK - pozitivní	114	16	1	131
Fúze NTRK - negativní	4	273	6	283
Neplatné*	4	28	53	85
Celkem	122	317	60	499

* Výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU) jsou neplatné na úrovni vzorku a běhu.

Analýzy shody, včetně neplatných výsledků rozboru TSO Comprehensive (EU), uvádí [Tabulka 84](#). Kromě neplatných výsledků rozboru TSO Comprehensive (EU) byla PPA 96,6 % (114/118; 95% CI: 91,5 % – 99,1 %) a NPA byl 94,5 % (273/289; 95% CI: 91,2 % – 96,8 %).

Tabulka 84 Studie přesnosti NTRK: PPA a NPA výsledku získaného rozbořem TSO Comprehensive (EU) ve srovnání s výsledkem získaným ortogonální metodou pro detekci fúzí NTRK

Měření shody	Kromě neplatných výsledků rozboru TSO Comprehensive (EU)		Včetně neplatných výsledků rozboru TSO Comprehensive (EU)	
	Shoda, % (n/N)	95% CI*	Shoda, % (n/N)	95% CI*
PPA	96,6 (114/118)	91,5, 99,1	93,4 (114/122)	87,5, 97,1
NPA	94,5 (273/289)	91,2, 96,8	86,1 (273/317)	81,8, 89,7

* 95% CI na základě (přesné) Clopper-Pearsonovy metody.

Klinická překlenovací studie pro detekci fúzí NTRK1, NTRK2 a NTRK3

Klinické ověření rozboru TSO Comprehensive (EU) pro detekci fúzí NTRK1, NTRK2 nebo NTRK3 u pacientů se solidními nádory, kteří by mohli mít prospěch z léčby larotrektrinibem, byla prokázána v klinické překlenovací studii. Studie byla provedena s cílem posoudit klinickou účinnost rozboru TSO Comprehensive (EU) k identifikaci pacientů s fúzí NTRK1, NTRK2 nebo NTRK3 pozitivních pro léčbu larotrektrinibem a posoudit shodu mezi rozbohem TSO Comprehensive (EU) a lokálními testovacími metodami (LT) (používanými ke stanovení stavu fúze NTRK pro klinické studie s larotrektrinibem).

Lokální testovací metody zahrnují sekvenování nové generace (NGS), fluorescenční in situ hybridizaci (FISH), polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a rozbor NanoString. Fúze NTRK (ETV6 NTRK3) byly odvozeny u pacientů s infantilním fibrosarkomem, kteří měli dokumentovanou translokaci ETV6 zjištěnou metodou FISH. Většina z 235 pacientů ve studii s larotrektrinibem se známým stavem fúze NTRK byla testována metodami NGS.

K datu uzávěrky údajů 15. července 2019 bylo do studie zařazeno 279 pacientů. Z 279 pacientů mělo 208 fúzí NTRK pozitivní. Z 208 pozitivních pacientů jich 164 tvořilo rozšířený soubor primární účinnosti larotrektrinibu (ePAS4).

Primárním výstupem analýzy účinnosti larotrektrinibu byla celková míra odezvy (ORR) podle hodnocení nezávislé kontrolní komise (IRC) v souhrnném souboru dat ze tří klinických studií. ORR byla hodnocena na základě podílu pacientů s nejlepší celkovou odezvou potvrzenou kompletní odezvou nebo potvrzenou částečnou odezvou na základě kritérií RECIST, verze 1.1. ORR byla u souboru pacientů ePAS4 léčených larotrektrinibem 72,6 % (95% CI [65,1 %, 79,2 %]) a týkala se pacientů s 16 různými typy nádorů.

Informace o vzorcích

Soubor vzorků zahrnoval širokou škálu typů nádorů a vzorky od dětí i dospělých pacientů.

K 15. červenci 2019 bylo do studií s larotrektrinibem zařazeno 279 pacientů. Z toho 235 pacientů mělo známý stav fúze NTRK stanovený metodou LT: 208 bylo pozitivních a 27 negativních. U 44 pacientů nebyl stav fúze NTRK znám, protože pro zařazení pacientů do fází zvyšování dávky ve studiích NCT02122913 a SCOUT NCT02637687 nebylo testování vyžadováno. Do klinické překlenovací studie rozbohem TSO Comprehensive (EU) byly zařazeny vzorky od pacientů zařazených do studie s larotrektrinibem k 15. červenci 2019 se známým stavem fúze NTRK (208 pozitivních pacientů a 27 negativních pacientů) a doplňkové vzorky, u kterých byla pomocí reprezentativních metod LT zjištěna negativita fúze NTRK.

Z 208 pozitivních vzorků ze studie s larotrektrinibem bylo 154 vzorků k dispozici pro testování pomocí rozboru TSO Comprehensive (EU). Z nich 138 mělo platné výsledky. Patnáct vzorků bylo neplatných z důvodu nevyhovujících metrik kvality sekvenování vzorků a 1 vzorek nebyl testován z důvodu odchylky od protokolu. Z 27 negativních vzorků ze studie s larotrektrinibem bylo 24 vzorků k dispozici pro testování. Z toho 22 mělo platné výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU). Dva vzorky byly neplatné z důvodu nevyhovujících metrik kvality sekvenování vzorků.

Doplňkové vzorky byly testovány pomocí jedné ze dvou reprezentativních metod LT. Bylo získáno více než 350 vzorků, které byly analyzovány na obsah nádoru. Z doplňkových vzorků splňujících požadavky na vzorek, bylo 266 úspěšně extrahováno a reprezentativní metodou LT potvrzeno, že je fúze NTRK negativní. Z těchto vzorků bylo 260 k dispozici pro rozbor TSO Comprehensive (EU), přičemž 222 z nich mělo platné výsledky. 38 vzorků

bylo neplatných z důvodu nesplnění metrik pro sekvenování vzorků ($n = 25$) nebo chybného běhu sekvenování ($n = 13$). Z celkového počtu fúzí NTRK, které byly negativní, bylo 222 doplňkových vzorků a 22 zkušebních vzorků s larotrektnibem.

Shoda výsledků

Celkově bylo TSO Comprehensive (EU) testováno 437 vzorků. Z 208 pacientů s pozitivní fúzí NTRK bylo 153 pacientů, kteří měli k dispozici vzorky a byli testováni TSO Comprehensive (EU), přičemž bylo získáno 138 platných výsledků a 15 neplatných výsledků.

Shodu výsledků TSO Comprehensive (EU) s výsledky metod LT, se zahrnutím i vyloučením neplatných výsledků TSO Comprehensive (EU), uvádí [Tabulka 85](#).

Tabulka 85 Klinická překlenovací studie NTRK: Shoda mezi metodami rozboru TSO Comprehensive (EU) a LT pro detekci fúzí NTRK

Měření shody	Kromě neplatných výsledků rozboru TSO Comprehensive (EU)		Včetně neplatných výsledků rozboru TSO Comprehensive (EU)	
	Shoda, % (n/N)	95% CI*	Shoda, % (n/N)	95% CI*
PPA	89,1 (123/138)	82,7, 93,8	80,4 (123/153)	73,2, 86,4
NPA	96,3 (235/244)	93,1, 98,3	82,7 (235/284)	77,8, 87,0
OPA	93,7 (358/382)	90,8, 95,9	81,9 (358/437)	78,0, 85,4

* Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti byly vypočteny pomocí (přesné) Clopper-Pearsonovy metody.

Analýza citlivosti vůči chybějícím výsledkům testu TSO Comprehensive (EU) prokázala spolehlivost analýzy shody. Chybějící výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU) u pacientů s pozitivitou fúze NTRK stanovenou metodou LT ($n = 70$) byly přiřazeny pomocí logického regresního modelu. Odhady shody (se započtenými přiřazenými hodnotami) uvádí [Tabulka 86](#).

Tabulka 86 Klinická překlenovací studie NTRK: Shoda mezi rozbořem TSO Comprehensive (EU) a metodami LT pro detekci fúzí NTRK se započtenými přiřazenými hodnotami u pacientů s pozitivitou stanovenou metodou LT u nichž chybějí výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU)

Měření shody	Shoda, %	95% CI*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Chybějící výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU) u pacientů s negativitou fúze stanovenou metodou LT nebyly přiřazeny.

* Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti (CI) byly vypočteny na základě metody opakovaného přiřazení Boot. Metoda opakovaného přiřazení Boot je krok bootstrapu vložený do opakovaného přiřazení (Schomaker a Heumann, 2018).

Shody mezi rozbořem TSO Comprehensive (EU) a lokálními testovacími metodami (LT) (rozdělenými podle typu, například RNA NGS, FISH) uvádí [Tabulka 87](#).

Tabulka 87 Klinická překlenovací studie NTRK: Shoda mezi rozbořem TSO Comprehensive (EU) a metodami LT pro detekci fúzí NTRK rozdělenými podle typu metody LT

Typ metody LT	Měření shody	Shoda, % (n/N)	95% CI ¹
DNA NGS	PPA	84,2 (32/38)	(68,7, 94,0)
	NPA	88,9 (16/18)	(65,3, 98,6)
	OPA	85,7 (48/56)	(73,8, 93,6)
RNA NGS ²	PPA	91,5 (75/82)	(83,2, 96,5)
	NPA	96,9 (218/225)	(93,7, 98,7)
	OPA	95,4 (293/307)	(92,5, 97,5)
FISH	PPA	80,0 (8/10)	(44,4, 97,5)
	NPA	Nevypočítává se (1/1)	Nevypočítává se
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Nevypočítává se (0/0)	Nevypočítává se
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Nevypočítává se: Pro podskupiny s počtem vzorků < 5 nebyla vypočtena statistická shoda.

¹ Oboustranné 95% intervaly spolehlivosti byly vypočteny pomocí (přesné) Clopper-Pearsonovy metody.

² Zahrnuje metody NGS, které používají pouze RNA a DNA i RNA.

Ze 437 vzorků testovaných rozbořem TSO Comprehensive (EU) mělo 24 nesouhlasné výsledky s výsledky stanovenými metodami LT: 15 z nich bylo u metod LT pozitivních a negativních u rozboru TSO Comprehensive (EU) a 9 z nich bylo u metod LT negativních a pozitivních u rozboru TSO Comprehensive (EU). Z 24 vzorků s neshodnými výsledky bylo 8 testováno metodou LT DNA NGS, 14 metodou LT RNA NGS a 2 metodou FISH.

Ověřená nezávislá metoda NGS potvrdila výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU) u 14 z 24 vzorků s nesouhlasnými výsledky. U zbývajících 10 vzorků byly výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU) nesouhlasné jak s výsledky stanovenými metodami LT, tak s výsledky stanovenými nezávislou metodou NGS.

Výsledky klinické účinnosti

V rámci kohorty ePAS4 byla účinnost larotrektinibu v populaci s pozitivitou u rozboru TSO Comprehensive (EU) a u metod LT (97 pacientů, ORR = 78,4 %, 95% CI [68,8 %, 86,1 %]) podobná účinnosti larotrektinibu v rámci souboru ePAS4 pro celou populaci (164 pacientů, ORR = 72,6 %, 95% CI [65,1 %, 79,2 %]) (Tabulka 88). Z 97 pacientů v rámci souboru ePAS4 s pozitivitou u rozboru TSO Comprehensive (EU) byla u 28 (28,9 %) pacientů zaznamenána úplná odezva / chirurgická úplná odezva a u 48 (49,5 %) pacientů byla zaznamenána částečná odezva.

Ze 13 pacientů s negativitou u rozboru TSO Comprehensive (EU) a pozitivitou stanovenou metodou LT byla u 1 (7,7 %) pacienta zaznamenána úplná odezva a u 2 (15,4 %) pacientů byla zaznamenána částečná odezva na léčbu larotrektnibem.

Tabulka 88 Klinická překlenovací studie NTRK: ORR pro pacienty s pozitivitou stanovenou metodou LT a výsledky TSO Comprehensive (EU) v ePAS4

		Stav fúze stanovený metodou LT pozitivní N = 164	TSO Comprehensive (EU) Pozitivní a LT pozitivní N = 97	TSO Comprehensive (EU) Negativní a LT pozitivní N = 13
Nejlepší celková odezva, n (%)	Úplná odezva	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Úplná chirurgická odezva	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Částečná odezva	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabilizovaná nemoc	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progresivní průběh nemoci	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Nelze vyhodnotit	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Celková míra odezvy	Počet pacientů, n	164	97	13
	Počet pacientů s CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR (%) (95% CI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Zkratky: CR = úplná odezva, PR = částečná odezva, sCR = úplná chirurgická odezva.

* Oboustranný 95% interval spolehlivosti byl vypočten pomocí (přesné) Clopper-Pearsonovy metody.

U 54 pacientů chybí výsledky rozboru TSO Comprehensive (EU).

Údaje z této studie potvrzují bezpečnost a účinnost rozboru TSO Comprehensive (EU) pro identifikaci pacientů se solidními nádory s fúzí NTRK, kteří by mohli být vhodní pro léčbu larotrektnibem.

Literatura

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Zobrazeno 3. října 2016.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Zobrazeno 3. října 2016.

Historie revizí

Revize	Datum	Popis změny
Dokument č. 200007789 v08	Květen 2025	Odstraněn odkaz na verze softwaru a čísla dílů. Aktualizována omezení postupu: • Informace o nekrotické tkáni. • Informace o obsahu MSI nádoru. Aktualizace: • Poznámka pod čarou NTC platná pro minimální i maximální knihovny. • Zařízení a materiály uvádějí specifikace centrifugy destiček a stupnici pipet. • Výpočet přebytku SPB od 1,05x do 1,15x. • Terminologie pro MET exon 14 del změněna na přeskočení MET exon 14. Přidáno: • Poznámka pro SMB v Prvním a Druhém zachycení cílů. • Úvod k Přípravě na sekvenování. • Další informace o ultrasonikátoru. Přidána objasnění a aktualizované výsledky pro funkční charakteristiky: • Interferující látky. • Přesnost pro profilování nádoru a platnost vzorku. • Mez detekce studie 1 a 2. • Přesnost v rámci laboratoře ve studii 1. • Reprodukovatelnost ve studii 2. • Informace o stabilitě knihovny a skladování knihovny. • Mez blanku. Aktualizace jazyka a gramatiky.

Revize	Datum	Popis změny
Dokument č. 200007789 v07	Leden 2024	- Do části Omezení postupu byly přidány následující informace: - Požadavky na vzorky nekrotické tkáně a obsahu nádoru pro mutace MSI s vysokým a somatickým driverem. - Potenciální interference hemoglobinu. - Detekční limity v genu RET a fúzní volání mimo hranice anotovaného genu. - Delece genů se neuvádějí. - Aktualizováno pro použití se softwarem TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager verze 2.3.7. - Byly doplněny informace o požadovaném, ale nedodaném vybavení a materiálu, včetně dvou dalších konfigurací ultrazvukového zařízení. - Následující informace o vzorcích byly aktualizované: - Obsah nekrotické tkáně. - Účinky proteinázy K a hemoglobinu. - Skladování FFPE fixovaného sklíčka a purifikované nukleové kyseliny. - Byly přidány informace pro zlepšení manipulace s reagensy, pracovního postupu a řešení problémů při selhání běhu kontroly kvality. - Do výkonnostních charakteristik byl doplněn kontextu a upřesnění: - Křížová kontaminace - Hodnocení sad pro extrakci nukleové kyseliny - Interferující látky - Stabilita nukleových kyselin a FFPE fixovaných sklíček - Klinická účinnost NTRK - Aktualizace jazyka a gramatiky
Dokument č. 200007789 v06	únor 2023	- Další prohlášení v části Omezení - Aktualizace jazyka z hlediska konvencí, gramatiky a srozumitelnosti - Oprava tabulek 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 - Prohlášení o přítomnosti sraženin v reagentu FSM - Aktualizované specifikace termocykléru a žlabu v seznamu zařízení a materiálů
Dokument č. 200007789 v05	Září 2022	Aktualizace tabulek reprodukovatelnosti studie 2

Revize	Datum	Popis změny
Dokument č. 200007789 v04	červen 2022	• Přidán analytický modul TSO Comprehensive v2.3.5 PNs • Odstraněn analytický modul TSO Comprehensive v2.3.3 PNs • Aktualizovaná terminologie v části Mez blanku
Dokument č. 200007789 v03	duben 2022	• Byly přidány informace o charakteristice účinnosti týkající se fúzí NTRK • Bylo přidáno označení URČENO POUZE NA EXPORT • Bylo aktualizováno prohlášení o zamýšleném použití o tvrzení NTRK1-3 CDx • Byly doplněny informace týkající součástí produktu o čísla dílů součástí softwaru
Dokument č. 200007789 v02	únor 2022	• Byl opraven chybný odkaz na tabulku • Bylo přidáno omezení týkající se germinálních a somatických variant • Byl zpřesněn jazyk týkající se detekce genové amplifikace
Dokument č. 200007789 v01	Prosinec 2021	• Byla aktualizována omezení pro postupy • Byly vyjasněny specifikace magnetického stojanu a termocykléru v seznamu vybavení a materiálů
Dokument č. 200007789 v00	Listopad 2021	První vydání

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejích přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva kterýchkoli třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYNŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŽ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).

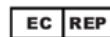
© 2025 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejích příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách viz adresa www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktní údaje



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornie 92122, Spojené státy americké
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Štítky na produktech

Úplné vysvětlení symbolů, které jsou uvedeny na balení a označení produktů, naleznete v přehledu symbolů na adrese support.illumina.com na kartě *Documentation* (Dokumentace) pro vaši sadu.