

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

Ένθετο συσκευασίας

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ. ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ.

Προβλεπόμενη χρήση

Το TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) είναι μια *in vitro* διαγνωστική εξέταση που χρησιμοποιεί στοχευόμενη αλληλούχηση επόμενης γενιάς για την ανίχνευση παραλλαγών σε 517 γονίδια χρησιμοποιώντας νουκλεϊκά οξέα που εκχυλίζονται από δείγματα ιστού όγκου μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE) από καρκινοπαθείς ασθενείς με συμπαγείς κακοήθεις νεοπλασίες με χρήση του οργάνου Illumina® NextSeq™ 550Dx. Η εξέταση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση παραλλαγών ενός νουκλεοτιδίου, πολυνουκλεοτιδικών παραλλαγών, προσθηκών, διαγραφών και γονιδιακών ενισχύσεων από DNA, καθώς και γονιδιακών συντήξεων και παραλλαγών ματίσματος από RNA. Η εξέταση αναφέρει επίσης μια βαθμολογία φορτίου μεταλλάξεων του όγκου (TMB) και την κατάσταση μικροδορυφορικής αστάθειας (MSI).

Η εξέταση προορίζεται ως συνοδευτική διαγνωστική εξέταση για την ταυτοποίηση καρκινοπαθών ασθενών για αντιμετώπιση με τη στοχευμένη θεραπεία που αναφέρεται στον [Πίνακα 1](#), σύμφωνα με την εγκεκριμένη επισήμανση του θεραπευτικού προϊόντος. Επιπλέον, η εξέταση προορίζεται για την παροχή πληροφοριών σχετικά με τον προσδιορισμό του προφίλ του όγκου για χρήση από ειδικευμένους επαγγελματίες υγείας σύμφωνα με τις επαγγελματικές κατευθυντήριες οδηγίες και δεν είναι οριστική ή κανονιστική για την επισημασμένη χρήση οποιουδήποτε συγκεκριμένου θεραπευτικού προϊόντος.

Πίνακα 1 Ένδειξη συνοδευτικών διαγνωστικών εξετάσεων

Τύπος όγκου	Βιοδείκτες	Στοχευμένη θεραπεία
Συμπαγείς όγκοι	Γονιδιακές συντήξεις NTRK1, NTRK2 και NTRK3	VITRAKVI® (λαροτρεκτινίμη)

Συνοπτική επεξήγηση και παρουσίαση του προσδιορισμού

Κλινική περιγραφή

Ο καρκίνος είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως και μπορεί δυνητικά να προέλθει από οποιονδήποτε ιστό.^{1, 2} Η ανάλυση της γενετικής βάσης ενός καρκίνου είναι σημαντική για τον εντοπισμό ασθενών που μπορούν να επωφεληθούν από στοχευμένες θεραπείες και για την ανάπτυξη νέων μεθόδων θεραπείας. Διάφορα γονίδια έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση ή την εξέλιξη του καρκίνου και πολλοί καρκίνοι φέρουν μια ποικιλία παραλλαγών που επηρεάζουν αυτά τα γονίδια και τις λειτουργίες τους. Αυτές οι

παραλλαγές είναι δυνατόν να περιλαμβάνουν γονιδιακές μεταλλάξεις, όπως παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου (SNV), πολυνουκλεοτιδικές παραλλαγές (MNV), προσθήκες ή διαγραφές, γονιδιακές ενισχύσεις, συντήξεις γονιδίων και παραλλαγές ματίσματος. Μια άλλη συνέπεια των γονιδιακών μεταλλάξεων του καρκίνου είναι η εμφάνιση νεοαντιγόνων που προκαλούν ειδικές για τον καρκίνο ανοσοαποκρίσεις. Η μεταλλακτική κατάσταση ενός καρκίνου μπορεί να αντιπροσωπεύεται από TMB και MSI, που είναι γονιδιωματικές υπογραφές οι οποίες σχετίζονται με τη γενομική αστάθεια και την εμφάνιση νεοαντιγόνων του καρκίνου.

Το TruSight Oncology Comprehensive είναι μια ποιοτική εξέταση ολοκληρωμένου γονιδιωματικού προφίλ (CGP) με αλληλούχιση επόμενης γενιάς (NGS) που αξιολογεί ευρέως τις γονιδιωματικές παραλλαγές σε ένα μεγάλο πάνελ γονιδίων που σχετίζονται με τον καρκίνο τα οποία παρατίθενται στον [Πίνακα 2](#). Ο προσδιορισμός ανιχνεύει μικρές παραλλαγές σε 517 γονίδια, συν γονιδιακές ενισχύσεις, συντήξεις και παραλλαγές ματίσματος, όπως υποδεικνύεται στον [Πίνακα 2](#). Ο προσδιορισμός παρέχει κάλυψη αλληλουχίας κωδικοποίησης για όλα τα γονίδια εκτός από το TERT, όπου καλύπτεται μόνο η περιοχή υποκινητή, και αξιολογεί τη βαθμολογία TMB και την κατάσταση MSI. Αυτοί οι στόχοι προσδιορισμού περιλαμβάνουν περιεχόμενο που αναφέρεται από επαγγελματικούς οργανισμούς και άλλες σημαντικές κατευθυντήριες οδηγίες των ΗΠΑ. Οι ανεξάρτητες δημοσιεύσεις των κοινοπραξιών και η φαρμακευτική έρευνα τελικού σταδίου επηρέασαν επίσης τον σχεδιασμό του προσδιορισμού TSO Comprehensive.

Για μια λίστα των περιοχών που εξαιρούνται από την αντιστοίχιση παραλλαγών, ανατρέξτε στη *TruSight Oncology Comprehensive Λίστα αποκλεισμού* (αρ. εγγράφου 200009524) που διατίθεται από τον [ιστότοπο υποστήριξης της Illumina](#).

Στον [Πίνακα 2](#), προσδιορίζονται τέσσερις κατηγορίες τύπων παραλλαγών: Μικρή παραλλαγή DNA (S), γονιδιακή ενίσχυση (A), σύντηξη (F) και παραλλαγή ματίσματος (Sp). Οι μικρές παραλλαγές DNA περιλαμβάνουν SNV, MNV και προσθήκες και διαγραφές.

Πίνακα 2 TSO Comprehensive (EU) Γονιδιακή ομάδα προσδιορισμού

Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής
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

Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής
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
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

Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής
55	695	BTB	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
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	INH1	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

Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής
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
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

Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής
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	ERRF1	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
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	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι

Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής	Αρ.	Αναγνωριστικό Entrez	Γονίδιο	Τύπος παραλλαγής
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι

Αρχές της διαδικασίας

Ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) είναι μια εξέταση κατανομής που εκτελείται χειροκίνητα με χρήση εκχυλισμένων νουκλεϊκών οξέων ως υλικό εισόδου. Το DNA ή/και το RNA που εκχυλίζεται από ιστό μονιμοποιημένο σε φορμαλίνη και εγκλεισμένο σε παραφίνη (FFPE) χρησιμοποιείται για την προετοιμασία βιβλιοθηκών, οι οποίες στη συνέχεια εμπλουτίζονται για γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο και υποβάλλονται σε αλληλούχιση στο όργανο NextSeq 550Dx.

Ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) περιλαμβάνει τις ακόλουθες διαδικασίες.

- Προετοιμασία και εμπλουτισμός βιβλιοθηκών** — Για RNA, 40 ng συνολικά μετατρέπονται σε δίκλωνο συμπληρωματικό DNA (cDNA). Για γονιδιωματικό DNA (gDNA), 40 ng του gDNA διατέμνονται σε μικρά θραύσματα. Προσαρμοστές γενικής χρήσης για αλληλούχιση συνδέονται στα θραύσματα cDNA και gDNA. Οι αλληλουχίες των προσαρμοστών P5 και P7 ενσωματώνονται σε κάθε βιβλιοθήκη για να επιτρέψουν τη σύλληψη τμημάτων της βιβλιοθήκης στην επιφάνεια της κυψελίδας ροής κατά τη διάρκεια της αλληλούχισης. Οι προσαρμοστές περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες ευρετηρίων i5 και i7 για την ταυτοποίηση κάθε μεμονωμένου δείγματος και, στην περίπτωση βιβλιοθηκών από δείγματα gDNA, μεμονωμένων μορίων με τη χρήση μοναδικών μοριακών αναγνωριστικών (UMI). Στη συνέχεια, οι βιβλιοθήκες εμπλουτίζονται για τα συγκεκριμένα γονίδια ενδιαφέροντος χρησιμοποιώντας μια μέθοδο που βασίζεται στη σύλληψη. Οι αλληλουχίες βιοτινυλιωμένων ανιχνευτών που εκτείνονται σε περιοχές γονιδίων ενδιαφέροντος που στοχεύονται από τον προσδιορισμό υβριδίζονται στις βιβλιοθήκες. Οι ανιχνευτές και οι υβριδοποιημένες στοχευόμενες βιβλιοθήκες απομονώνονται από μη στοχευόμενες βιβλιοθήκες μέσω σύλληψης με μαγνητικά σωματίδια στρεπταβιδίνης. Οι στοχευόμενες εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες πλένονται και ενισχύονται. Στη συνέχεια, η ποσότητα κάθε εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης κανονικοποιείται χρησιμοποιώντας μια μέθοδο με βάση τα σφαιρίδια για να διασφαλιστεί ίση αντιπροσώπευση στις ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες για αλληλούχιση.
- Αλληλούχιση και κύρια ανάλυση** — Κανονικοποιημένες, εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες ομαδοποιούνται και συγκεντρώνονται σε μια κυψελίδα ροής και, στη συνέχεια, υποβάλλονται σε αλληλούχιση χρησιμοποιώντας χημική μέθοδο αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (SBS) στο NextSeq 550Dx. Η χημική μέθοδος SBS χρησιμοποιεί μια μέθοδο αναστρέψιμου τερματιστή για την ανίχνευση μεμονωμένων βάσεων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTP) επισημασμένων μέσω φθορισμού καθώς αυτές ενσωματώνονται στις αναπτυσσόμενες αλυσίδες DNA. Κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου αλληλούχισης, ένα μόνο dNTP προστίθεται στην αλυσίδα νουκλεϊκών οξέων. Η επισήμανση dNTP χρησιμεύει ως τερματιστής πολυμερισμού. Μετά από κάθε ενσωμάτωση dNTP, η φθορίζουσα χρωστική απεικονίζεται για την ταυτοποίηση της βάσης και, στη συνέχεια, διασπάται ώστε να επιτραπεί η ενσωμάτωση του επόμενου νουκλεοτιδίου. Τέσσερα αναστρέψιμα dNTP (A, G, T και C) που δεσμεύονται στον τερματιστή υπάρχουν

ως μεμονωμένα, ξεχωριστά μόρια. Ως αποτέλεσμα, ο φυσικός ανταγωνισμός ελαχιστοποιεί τη μεροληψία ενσωμάτωσης. Κατά τη διάρκεια της κύριας ανάλυσης, οι αντιστοιχίσεις βάσεων πραγματοποιούνται απευθείας από τις μετρήσεις έντασης σήματος κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου αλληλούχησης, με αποτέλεσμα την αλληλούχηση «base-by-base». Σε κάθε αντιστοίχιση βάσης εκχωρείται μια βαθμολογία ποιότητας.

- **Δευτερεύουσα ανάλυση**—Η Μονάδα ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) βρίσκεται στο όργανο NextSeq 550Dx ως μέρος του λογισμικού Local Run Manager για τη διευκόλυνση της ρύθμισης της εκτέλεσης TSO Comprehensive (EU) και για την εκτέλεση της δευτερεύουσας ανάλυσης των αποτελεσμάτων αλληλούχησης. Η δευτερεύουσα ανάλυση περιλαμβάνει επικύρωση της επεξεργασίας του κύκλου εκτέλεσης και του ποιοτικού ελέγχου, ακολουθούμενη από αποπολυπλεξία, δημιουργία αρχείων FASTQ, ευθυγράμμιση και αντιστοίχιση παραλλαγών. Η αποπολυπλεξία διαχωρίζει τα δεδομένα από τις ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες με βάση τα μοναδικά ευρετήρια αλληλούχησης που προστέθηκαν κατά τη διαδικασία προετοιμασίας της βιβλιοθήκης. Δημιουργούνται ενδιάμεσα αρχεία FASTQ τα οποία περιέχουν τις αναγνώσεις αλληλούχησης για κάθε δείγμα και τις βαθμολογίες ποιότητας, εξαιρουμένων των αναγνώσεων από οποιεσδήποτε συστάδες οι οποίες δεν διήλθαν από το φίλτρο. Στη συνέχεια, οι αναγνώσεις αλληλούχησης ευθυγραμμίζονται ως προς ένα γονιδίωμα αναφοράς για τον προσδιορισμό μιας σχέσης μεταξύ των αλληλουχιών και τους εκχωρείται μια βαθμολογία με βάση τις περιοχές ομοιότητας. Οι ευθυγραμμισμένες αναγνώσεις εγγράφονται σε αρχεία σε μορφή BAM. Το λογισμικό του προσδιορισμού χρησιμοποιεί ξεχωριστούς αλγόριθμους για βιβλιοθήκες που δημιουργούνται από δείγματα DNA ή/και RNA για την αντιστοίχιση μικρών παραλλαγών DNA, γονιδιακών ενισχύσεων, TMB και MSI για δείγματα DNA και συντήξεων και παραλλαγών ματίσματος για δείγματα RNA. Η μονάδα λογισμικού ανάλυσης δημιουργεί πολλαπλές εξόδους, που περιλαμβάνουν μετρήσεις αλληλούχησης και αρχεία μορφής αντιστοίχισης παραλλαγών (VCF). Τα αρχεία VCF περιέχουν πληροφορίες για παραλλαγές που βρίσκονται σε συγκεκριμένες θέσεις σε ένα γονιδίωμα αναφοράς. Για κάθε δείγμα δημιουργούνται μετρήσεις αλληλούχησης και μεμονωμένα αρχεία εξόδου. Ανατρέξτε στο *Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200008661) για λεπτομέρειες σχετικά με τη δευτερεύουσα και την τριτεύουσα ανάλυση.
- **Τριτεύουσα ανάλυση**—Η τριτεύουσα ανάλυση, που πραγματοποιείται από τη Μονάδα ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU), περιλαμβάνει υπολογισμούς TMB και MSI, αντιστοιχίσεις συνοδευτικών διαγνωστικών εξετάσεων, προσδιορισμό του προφίλ του όγκου από τις παραλλαγές σε δύο επίπεδα κλινικής σημασίας χρησιμοποιώντας μια γνωσιακή βάση (KB) και τον τύπο ιστού, καθώς και δημιουργία αναφορών αποτελεσμάτων. Ο προσδιορισμός του προφίλ του όγκου μπορεί επίσης να αναφέρεται ως ολοκληρωμένο γονιδιωματικό προφίλ. Τα αποτελέσματα της ερμηνευμένης παραλλαγής και τα αποτελέσματα των βιοδεικτών TMB και MSI συνοψίζονται στην αναφορά αποτελεσμάτων του TSO Comprehensive (EU).

Περιορισμοί της διαδικασίας

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση μόνο.

- Για χρήση μόνο κατόπιν συνταγογράφησης. Η εξέταση πρέπει να χρησιμοποιείται σύμφωνα με τους κλινικούς εργαστηριακούς κανονισμούς.
- Τα γονιδιωματικά ευρήματα που παρατίθενται στον [Πίνακα 2](#) της προβλεπόμενης χρήσης δεν είναι συνταγογραφούμενα ή καθοριστικά για την επισημασμένη χρήση οποιουδήποτε συγκεκριμένου θεραπευτικού προϊόντος.
- Για τις παραλλαγές που παρατίθενται στην αναφορά αποτελεσμάτων του TSO Comprehensive (EU) στην ενότητα Γονιδιωματικά ευρήματα με κλινικά σημαντικά στοιχεία (Επίπεδο 2) και Γονιδιωματικά ευρήματα με δυνητική κλινική σημασία (Επίπεδο 3), δεν έχει πραγματοποιηθεί κλινική επικύρωση.
- Οι αποφάσεις σχετικά με τη φροντίδα και τη θεραπεία των ασθενών πρέπει να βασίζονται στην ανεξάρτητη ιατρική κρίση του θεράποντος ιατρού, λαμβάνοντας υπόψη όλες τις ισχύουσες πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση του ασθενούς, όπως το ιστορικό του ασθενούς και το οικογενειακό ιστορικό, τις κλινικές εξετάσεις, τις πληροφορίες από άλλες διαγνωστικές εξετάσεις και τις προτιμήσεις του ασθενούς, σύμφωνα με το πρότυπο φροντίδας σε μια δεδομένη κοινότητα.
- Η ποιότητα του δείγματος FFPE είναι εξαιρετικά μεταβλητή. Δείγματα που δεν υποβλήθηκαν σε τυπικές διαδικασίες καθήλωσης ενδέχεται να μην παράγουν εκχυλισμένα νουκλεϊκά οξέα που πληρούν τις απαιτήσεις ποιοτικού ελέγχου του προσδιορισμού ([Ποιοτικός έλεγχος στη σελίδα 90](#)). Ιστοτεμάχια FFPE που έχουν αποθηκευτεί για περισσότερο από πέντε χρόνια έχουν επιδείξει χαμηλότερη εγκυρότητα.
- Οι επιδόσεις του TSO Comprehensive (EU) σε δείγματα που ελήφθησαν από ασθενείς οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση οργάνων ή ιστού δεν έχουν αξιολογηθεί.
- Οι υψηλές ποσότητες νεκρωτικού ιστού ($\geq 23\%$) μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) να ανιχνεύσει γονιδιακές ενισχύσεις και συντήξεις RNA.
- Οι σωματικές μεταλλάξεις-οδηγοί μπορεί να μην ανιχνευτούν αξιόπιστα εάν το περιεχόμενο του όγκου (ανά περιοχή) είναι μικρότερο από 20%.
- Η έκβαση της σταθερότητας των μικροδορυφόρων (MS-Stable) μπορεί να είναι αναξιόπιστη εάν η περιεκτικότητα του όγκου είναι μικρότερη από 30%. Η έκβαση της υψηλής μικροδορυφόρου (MSI-Υψηλή) είναι σωστή ανεξάρτητα από το περιεχόμενο του όγκου.
- Αιμοσφαιρίνη που σχετίζεται με μειώσεις των ιστών που υποστηρίζουν τις αναγνώσεις για παραλλαγές ματίσματος MET.
- Σε γονιδιώματα υψηλής αναδιάταξης με διαγραφές και απώλεια ετεροζυγωτίας, το λογισμικό TSO Comprehensive (EU) μπορεί να ταξινομήσει εσφαλμένα ένα δείγμα DNA ως επιμολυσμένο (CONTAMINATION_SCORE > 3106 και τιμή $p > 0,049$).
- Ένα αρνητικό αποτέλεσμα δεν αποκλείει την παρουσία μετάλλαξης κάτω από τα όρια ανίχνευσης (LoD) του προσδιορισμού.
- Η ευαισθησία για την ανίχνευση μικρών παραλλαγών DNA μπορεί να επηρεαστεί από:

- Γονιδιωματικό πλαίσιο χαμηλής πολυπλοκότητας.
- Αυξανόμενο μήκος παραλλαγής.
- Οι βαθμολογίες TMB μπορεί να είναι ανακριβείς στα παρακάτω πλαίσια:
 - Καθώς το περιεχόμενο του όγκου φτάνει στα επίπεδα όπου συγκλίνουν οι συχνότητες αλληλόμορφων παραλλαγών βλαστικής σειράς και οι συχνότητες σωματικών αλληλόμορφων παραλλαγών (VAF).
 - Σε πληθυσμούς που δεν εκπροσωπούνται καλά σε δημόσιες βάσεις δεδομένων.
- Οι γονιδιακές ενισχύσεις είναι οι μόνες παραλλαγές αριθμού αντιγράφων που αναφέρονται από το TSO Comprehensive (EU). Οι διαγραφές γονιδίων δεν αναφέρονται από τον προσδιορισμό.
- Οι αλγόριθμοι αντιστοίχισης σύντηξης στο λογισμικό προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) ενδέχεται να μην λαμβάνουν υπόψη στοιχεία από αναγνώσεις που εκτείνονται εκτός των ορίων των σχολιασμένων γονιδίων.
- Η ευαισθησία για την ανίχνευση συντήξεων μπορεί να επηρεαστεί:
 - Από χαμηλή πολυπλοκότητα της βιβλιοθήκης που οδηγεί σε μειωμένες υποστηρικτικές αναγνώσεις λόγω αποκλίσεων στη ροή εργασιών του προσδιορισμού (για παράδειγμα, ακολουθήστε τα βήματα ανάμειξης της ενότητας [Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA στη σελίδα 49](#)).
 - Όταν ένα μόνο γονίδιο εκτείνεται και στα δύο σημεία θραύσης.
 - Σε περιπτώσεις όπου πολλά σημεία θραύσης συντήξεων βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους με έναν ή περισσότερους εταίρους. Τα πολλαπλά σημεία θραύσης και οι εταίροι μπορεί να αναφέρονται ως ένα μεμονωμένο σημείο θραύσης και ένας μεμονωμένος εταίρος.
 - Από μικρά διάμεσα μεγέθη ενθέτων. Απαιτείται ελάχιστο διάμεσο μέγεθος ένθετων 80 bp, αλλά η ευαισθησία μειώνεται στο εύρος 80 – 100 bp.
 - Από χαμηλή πολυπλοκότητα αλληλουχίας ή ομόλογου γονιδιωματικού πλαισίου γύρω από τα σημεία θραύσης της σύντηξης.
- Η ανάλυση των γονιδίων που εμπλέκονται σε μια σύντηξη μπορεί να επηρεαστεί όταν προκύψουν σημεία θραύσης της σύντηξης σε γονιδιωματικές περιοχές που περιέχουν αλληλοεπικαλυπτόμενα γονίδια. Ο προσδιορισμός θα αναφέρει όλα τα γονίδια, οριοθετημένα με ερωτηματικό, εάν υπάρχουν πολλαπλά γονίδια που επικαλύπτουν ένα σημείο θραύσης.
- Η μη συνεπής κάλυψη στην περιοχή του προωθητή της TERT μπορεί να οδηγήσει σε No Result (Κανένα αποτέλεσμα) λόγω χαμηλού βάθους.
- Σφάλματα επισημειώσεων ή της KB μπορεί να προκαλέσουν ψευδώς θετικό ή ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα, συμπεριλαμβανομένης της καταχώρισης μιας παραλλαγής σε λάθος επίπεδο (μεταξύ γονιδιωματικών ευρημάτων με κλινικά σημαντικά στοιχεία (Επίπεδο 2) και γονιδιωματικών ευρημάτων με δυνητική κλινική σημασία (Επίπεδο 3)) ή οι πληροφορίες επισημείωσης στην αναφορά μπορεί να είναι εσφαλμένες. Τα σφάλματα επισημείωσης ή KB δεν επηρεάζουν τις παραλλαγές που αναφέρονται στα αποτελέσματα CDx. Η πιθανότητα σφάλματος υπάρχει από τις παρακάτω τρεις πηγές:
 - Επισημείωση παραλλαγών από το TSO Comprehensive (EU). Υπάρχει ποσοστό σφάλματος περίπου 0,0027%, με βάση μια ανάλυση 2.448.350 παραλλαγών από το COSMIC v92, συνεπώς υπάρχει μικρή πιθανότητα σφάλματος.

- Σφάλμα της KB λόγω της διαδικασίας επιμέλειας.
- Η σχετικότητα του περιεχομένου της KB αλλάζει με την πάροδο του χρόνου. Η αναφορά αντικατοπτρίζει τις γνώσεις κατά τη στιγμή που επιμελήθηκε η έκδοση της KB.
- Το TSO Comprehensive (EU) έχει σχεδιαστεί για την αναφορά σωματικών παραλλαγών κατά την αναφορά παραλλαγών με κλινικά σημαντικές ενδείξεις ή δυνητικά κλινικά σημαντικών παραλλαγών. Ως εξέταση μόνο όγκου, η αναφορά (κληρονομικών) παραλλαγών βλαστικής σειράς είναι δυνατή αλλά ακούσια. Το TSO Comprehensive (EU) χρησιμοποιεί μια KB για την αναφορά παραλλαγών χωρίς να επισημαίνει ρητά εάν είναι βλαστικής σειράς ή σωματικής προέλευσης.
- Η KB περιλαμβάνει μόνο θεραπευτικούς, διαγνωστικούς και προγνωστικούς συσχετισμούς που σχετίζονται με παραλλαγές που υπάρχουν σε ένα τεκμηριωμένο συμπαγές κακοήθες νεόπλασμα. Συσχετίσεις επιρρέπειας ή κινδύνου εμφάνισης καρκίνου δεν περιλαμβάνονται στην KB.
- Ο παρακάτω πίνακας εμφανίζει τις αλλαγές νουκλεοτιδίων για τρεις παραλλαγές RET που δεν μπορεί να ανιχνεύσει ο προσδιορισμός. Μπορούν να ανιχνευτούν και άλλες αλλαγές νουκλεοτιδίων για την ίδια αλλαγή αμινοξέων.

Πίνακα 3 Αλλαγές νουκλεοτιδίων για τρεις παραλλαγές RET

Αλλαγή αμινοξέων	Chr*	Position (Θέση)	Αλληλόμορφο αναφοράς	Εναλλακτική
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 CTAAGAGG

* Chr = Χρωμόσωμα

Εξαρτήματα προϊόντος

Η εξέταση TSO Comprehensive (EU) περιλαμβάνει τα ακόλουθα εξαρτήματα:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) κιτ (Illumina αρ. καταλόγου 20063092)—Το κιτ περιλαμβάνει αντιδραστήρια με επαρκή όγκο για τη δημιουργία 24 βιβλιοθηκών DNA και 24 βιβλιοθηκών RNA. Αυτός ο όγκος περιλαμβάνει δείγματα ασθενών και μάρτυρες. Οι μάρτυρες πωλούνται ξεχωριστά (ανατρέξτε στην ενότητα [Απαιτούμενα αντιδραστήρια, δεν παρέχονται στη σελίδα 19](#)).
- Γνωσιακή βάση: Ενημερώνεται τακτικά και είναι διαθέσιμη για λήψη στην Πύλη Lighthouse της Illumina.

- Μονάδα ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illumina αρ. καταλόγου 20051843), που περιλαμβάνει τα ακόλουθα εξαρτήματα:
 - TSO Comprehensive Δέματα αξιώσεων
 - TSO Comprehensive Σουίτα λογισμικού
 - TSO Comprehensive Κιτ USB

Ένας αντιπρόσωπος σέρβις της Illumina εγκαθιστά την κατάλληλη έκδοση της Μονάδας ανάλυσης TSO Comprehensive (EU) στο Local Run Manager όργανο NextSeq 550Dx. Για πληροφορίες σχετικά με την ανάλυση, ανατρέξτε στο Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (αρ. εγγράφου 200008661).

Αντιδραστήρια

Παρεχόμενα αντιδραστήρια

Τα παρακάτω αντιδραστήρια παρέχονται με το κιτ TSO Comprehensive (EU).

TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης RNA, κ ι δικός είδους 20031127

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα και νουκλεοτίδια	-25 °C έως -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα, πολυμεράση DNA, RNάση H και νουκλεοτίδια	-25 °C έως -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα και τυχαία εξαμερή	-25 °C έως -15 °C

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει αντίστροφη μεταγραφάση	-25 °C έως -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Κατάψυξη), κ ■ δικός είδους 20031118

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει T4 DNA πολυμεράσης και πολυνουκλεοτιδικής κινάσης	-25 °C έως -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα και νουκλεοτίδια	-25 °C έως -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα	-25 °C έως -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει λιγάση	-25 °C έως -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει ολιγονουκλεοτίδια γενικής αλληλούχησης	-25 °C έως -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει ολιγονουκλεοτίδια γενικής αλληλούχησης	-25 °C έως -15 °C

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα	-25 °C έως -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει DNA πολυμεράσης και νουκλεοτίδια	-25 °C έως -15 °C

TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Ψύξη), κ ■ δικός είδους 20031119

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα	2 °C έως 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Υδατικό διάλυμα που περιέχει μαγνητικά σφαιρίδια	2 °C έως 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Διάλυμα Tris EDTA	2 °C έως 8 °C

TruSight Oncology Comp Εκκινητές ευρετηρίου UP, κ 1 δικός είδους 20031120

Δραστικά συστατικά: Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων με μεμονωμένο με γραμμωτό κωδικό.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Χρησιμοποιήστε εκκινητές μοναδικού ευρετηρίου (UPxx) για δείγματα RNA ή DNA. Μη συνδυάζετε εκκινητές ευρετηριασμού CPxx και UPxx μαζί στην ίδια βιβλιοθήκη.

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

TruSight Oncology Comp Εκκινητές ευρετηρίου CP, κ ι δικός είδους 20031126

Δραστικά συστατικά: Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει εκκινητές ολιγονουκλεοτιδίων με μεμονωμένο με γραμμωτό κωδικό.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Χρησιμοποιείτε τους συνδυαστικούς εκκινητές ευρετηρίου (CPxx) μόνο για δείγματα DNA. Μη συνδυάζετε εκκινητές ευρετηριασμού CPxx και UPxx μαζί στην ίδια βιβλιοθήκη.

Εκκινητής ευρετηρίου	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Ευρετήριο i7	Αλληλουχία	Ευρετήριο i5	Αλληλουχία	Θερμοκρασία αποθήκευσης
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C έως -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C έως -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C έως -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C έως -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C έως -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C έως -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C έως -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C έως -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C έως -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C έως -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C έως -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C έως -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C έως -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C έως -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C έως -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C έως -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη), κ ι δικός είδους 20031123

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει φορμαμίδιο και άλατα	2 °C έως 8 °C

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα και παραμαγνητικά σφαιρίδια στερεάς φάσης ομοιοπολικά επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη	2 °C έως 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 μl	Διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου	2 °C έως 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα	2 °C έως 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει παραμαγνητικά σφαιρίδια στερεάς φάσης	2 °C έως 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα, 2-μερκαπτοαιθανόλη και φορμαμίδιο	2 °C έως 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα	2 °C έως 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα	2 °C έως 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Υδατικό διάλυμα που περιέχει μαγνητικά σφαιρίδια	2 °C έως 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη), κ ι δικός είδους 20031121

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει ολιγονουκλεοτίδια	-25 °C έως -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα	-25 °C έως -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει απορρυπαντικό	-25 °C έως -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει DNA πολυμεράσης και νουκλεοτίδια	-25 °C έως -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει εκκινητές P5 και P7	-25 °C έως -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει άλατα, 2-μερκαπτοαιθανόλη και φορμαμίδιο	-25 °C έως -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 ή PhiX)	20031492	1	10 μl	Ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα που περιέχει γονιδιωματικό DNA PhiX	-25 °C έως -15 °C

TruSight Oncology Comp Σετ περιεχομένου, κ ι δικός είδους 20031122

Αντιδραστήριο	Αριθμός είδους	Ποσότητα	Όγκος	Δραστικά συστατικά	Θερμοκρασία αποθήκευσης
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 μl	Δεξαμενή ανιχνευτών ολιγονουκλεοτιδίων	-25 °C έως -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 μl	Δεξαμενή ανιχνευτών ολιγονουκλεοτιδίων	-25 °C έως -15 °C

Απαιτούμενα αντιδραστήρια, δεν παρέχονται

Αντιδραστήρια προενίσχυσης

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents — Ανατρέξτε στην ενότητα [Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30](#) για τις απαιτήσεις αντιδραστηρίων.
- DNA and RNA Quantification Reagents — Ανατρέξτε στην ενότητα [Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30](#) για τις απαιτήσεις αντιδραστηρίων.
- TruSight Oncology Μάρτυρες:
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina αρ. καταλόγου 20065041)
 - TruSight Oncology RNA Control (Illumina αρ. καταλόγου 20065042)
- Αιθανόλη (EtOH) 100% (200 proof), βαθμού μοριακής βιολογίας
- RNase/DNase-free water

Αντιδραστήρια μετά την ενίσχυση

- NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) (Illumina αρ. καταλόγου 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 κύκλων)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 κύκλων)
- EtOH 100% (200 proof), βαθμού μοριακής βιολογίας
- RNase/DNase-free water

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Τα παρακάτω κουτιά αντιδραστηρίων αποστέλλονται κατεψυγμένα. Φυλάσσετε σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C.

Κουτί	Αριθμός είδους	Περιοχή εργαστηρίου
TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης RNA	20031127	Προενίσχυση
TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Κατάψυξη)	20031118	Προενίσχυση
TruSight Oncology Comp Εκκινητές ευρετηρίου UP	20031120	Προενίσχυση
TruSight Oncology Comp Εκκινητές ευρετηρίου CP	20031126	Προενίσχυση

Κουτί	Αριθμός είδους	Περιοχή εργαστηρίου
TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη)	20031121	Μετά την ενίσχυση
TruSight Oncology Comp Σετ περιεχομένου	20031122	Μετά την ενίσχυση

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Μην αποθηκεύετε τα αντιδραστήρια σε μονάδα αποθήκευσης με τεχνολογία χωρίς-πάγο ή σε ράφια πόρτας ψυγείου.

Τα παρακάτω κουτιά αντιδραστηρίων αποστέλλονται σε παγοκύστες για διατήρηση της θερμοκρασίας σε επίπεδα 0 °C έως 10 °C. Φυλάσσετε σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C.

Κουτί	Αριθμός είδους	Περιοχή εργαστηρίου
TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Ψύξη)	20031119	Προενίσχυση
TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη)	20031123	Μετά την ενίσχυση

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Μην καταψύχετε αντιδραστήρια που περιέχουν σφαιρίδια (LNB1, SPB και SMB).

- Οι αλλαγές στην όψη των αντιδραστηρίων μπορούν να υποδεικνύουν αλλοίωση των υλικών. Εάν προκύψουν αλλαγές στην όψη (π.χ. αλλαγές στο χρώμα των αντιδραστηρίων ή εμφανής θολερότητα με μικροβιακή μόλυνση), μην χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια.
- Τα FSM, SSM, ERA1-B και TCB1 μπορεί να έχουν σωματίδια που σχετίζονται με το προϊόν. Ακολουθήστε τις ειδικές κατευθυντήριες οδηγίες χειρισμού για κάθε αντιδραστήριο. Μετά την εκτέλεση των βημάτων ανάμειξης του FSM και του SSM, τα υπολειπόμενα λευκά σωματίδια που σχετίζονται με το προϊόν δεν θα επηρεάσουν τις επιδόσεις.
- Η σταθερότητα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) έχει αξιολογηθεί και οι επιδόσεις έχουν καταδειχθεί για έως και τέσσερις χρήσεις του κιτ. Τα αντιδραστήρια είναι σταθερά όταν αποθηκεύονται στις ενδεικνυόμενες θερμοκρασίες μέχρι την καθορισμένη ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην επισήμανση του κουτιού.

Εξοπλισμός και υλικά

Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται, δεν παρέχονται

Εξοπλισμός και υλικά προενίσχυσης

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Συσκευή παραγωγής υπερήχων με τα σχετικά παρελκόμενα Ανατρέξτε στις Ρυθμίσεις διαμόρφωσης συσκευής υπερήχων για κατακερματισμό DNA στη σελίδα 25.	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Θερμικός κυκλοποιητής με τις παρακάτω προδιαγραφές: - Θερμαινόμενο καπάκι που μπορεί να ρυθμιστεί στους 30 °C και 100 °C (ή να απενεργοποιηθεί, εάν δεν έχει δυνατότητα ρύθμισης στους 30 °C) - Με εύρος θερμοκρασίας 4 °C έως 99 °C - Ακρίβεια θερμοκρασίας $\pm 0,25$ °C - Συμβατός με πλάκες PCR 96 βοθρίων, 0,2 ml - Ανατρέξτε στην ενότητα Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας θερμικού κυκλοποιητή στη σελίδα 28	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Αναδευτήρας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Επωαστήρες μικροδειγμάτων (2) με ένθετα για πλάκες MIDI 96 βοθρίων (2)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Μικροφυγόκεντρος	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Φυγοκέντρωση πλάκας με τις ακόλουθες προδιαγραφές: - Συμβατός με μικροπλάκες 96 βοθρίων - Με δυνατότητα ταχύτητας $280 \times g$ (+/- 10%)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ανακίνηση πλάκας με τις ακόλουθες προδιαγραφές: - Τροχιά 2 mm - Δυνατότητα ανάδευσης στις 1.200 σ.α.λ. και στις 1.800 σ.α.λ.	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Σφήνα ή κύλινδρος σφράγισης	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Μαγνητική βάση με τις ακόλουθες προδιαγραφές: • Σχεδιασμένη για παραμαγνητική κατακρήμνιση/διαχωρισμό σφαιριδίων • Μαγνήτες στο πλάι της βάσης (όχι στο κάτω μέρος) • Συμβατός με πλάκες MIDI 96 βοθρίων	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πιπέτες ακριβείας με δυνατότητα επακριβούς χορήγησης όγκων από 2 µl έως 1000 µl με τις ακόλουθες προδιαγραφές: • Πιπέτα ενός ή πολλαπλών καναλιών με προσαύξηση 0,02 ml • Πιπέτα ενός ή πολλαπλών καναλιών με προσαύξηση 0,1 µl, 0,2 µl ή 0,5 µl • Πιπέτα ενός ή πολλαπλών καναλιών με προσαύξηση 1 µl ή 2 µl Οι πιπέτες πρέπει να βαθμονομούνται τακτικά και να είναι ακριβείς εντός του 5% του δηλωμένου όγκου.	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Βοήθημα πιπέτας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Παγωμένο ή ψυχρό μπλοκ	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ορολογικές πιπέτες των 10 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Αυτοκόλλητα στεγανοποιητικά για πλάκες 96 βοθρίων με τις ακόλουθες προδιαγραφές: • Αποκολλούμενα • Κατάλληλα για πλάκες PCR με πλήρες ή ήμισυ προστατευτικό περίβλημα • Ισχυρό συγκολλητικό που αντέχει σε πολλαπλές μεταβολές θερμοκρασίας από -20 °C έως 100 °C • Χωρίς DNase/RNase	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης χωρητικότητας 1,7 ml, χωρίς νουκλεάση	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Δεξαμενές αντιδραστηρίων χωρίς νουκλεάση (αναλώσιμο δοχείο, 50 ml) (ή ισοδύναμες)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Κωνικά σωληνάρια των 15 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Κωνικά σωληνάρια των 50 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Συμβατά ρύγχη πιπετών ανθεκτικά σε αερολύματα	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πλάκες αποθήκευσης 96 βοθρίων, 0,8 ml (πλάκες MIDI)	Fisher Scientific, κωδικός είδους AB-0859 ή ισοδύναμες
Πλάκες PCR 96 βοθρίων, συμβατές με θερμικό κυκλοποιητή, 0,2 ml (βοθρία πολυπροπυλενίου)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Εξοπλισμός και υλικά μετά την ενίσχυση

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Όργανο NextSeq 550Dx	Illumina, αρ. καταλόγου 20005715
Φυγοκέντρηση πλάκας με τις ακόλουθες προδιαγραφές: - Συμβατός με μικροπλάκες 96 βοθρίων - Με δυνατότητα ταχύτητας 280 × g (+/- 10%)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Θερμικός κυκλοποιητής με τις παρακάτω προδιαγραφές: - Θερμαινόμενο καπάκι (100 °C) - Με εύρος θερμοκρασίας 4 °C έως 99 °C - Ακρίβεια θερμοκρασίας ±0,25 °C - Συμβατός με πλάκες PCR 96 βοθρίων, 0,2 ml - Ανατρέξτε στην ενότητα Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας θερμικού κυκλοποιητή στη σελίδα 28	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Αναδευτήρας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Επωαστήρας μικροδειγμάτων με ένθετο για πλάκες MIDI 96 βοθρίων	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Συσκευή ξηρής θέρμανσης με τις ακόλουθες προδιαγραφές: - Εύρος θερμοκρασίας 25 °C έως 99 °C - Ακρίβεια θερμοκρασίας ±5 °C - Βεβαιωθείτε ότι τα σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης είναι συμβατά με τη συσκευή θέρμανσης	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ανακίνηση πλάκας με τις ακόλουθες προδιαγραφές: - Τροχιά 2 mm - Δυνατότητα ανάδευσης στις 1.200 σ.α.λ. και στις 1.800 σ.α.λ.	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Μικροφυγόκεντρος	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Σφήνα ή κύλινδρος σφράγισης	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Μαγνητική βάση με τις ακόλουθες προδιαγραφές: • Σχεδιασμένη για παραμαγνητική κατακρήμνιση/διαχωρισμό σφαιριδίων • Μαγνήτες στο πλάι της βάσης (όχι στο κάτω μέρος) • Συμβατός με πλάκες MIDI 96 βοθρίων	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πιπέτες ακριβείας με δυνατότητα επακριβούς χορήγησης όγκων από 2μl έως 1000 μl με τις ακόλουθες προδιαγραφές: • Πιπέτα ενός ή πολλαπλών καναλιών με προσαύξηση 0,02 ml • Πιπέτα ενός ή πολλαπλών καναλιών με προσαύξηση 0,1 μl, 0,2 μl ή 0,5 μl • Πιπέτα ενός ή πολλαπλών καναλιών με προσαύξηση 1 μl ή 2 μl Οι πιπέτες πρέπει να βαθμονομούνται τακτικά και να είναι ακριβείς εντός του 5% του δηλωμένου όγκου.	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Βοήθημα πιπέτας	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Ορολογικές πιπέτες των 10 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Αυτοκόλλητα στεγανοποιητικά για πλάκες 96 βοθρίων με τις ακόλουθες προδιαγραφές: • Αποκολλούμενα • Κατάλληλα για πλάκες PCR με πλήρες ή ήμισυ προστατευτικό περίβλημα • Ισχυρό συγκολλητικό που αντέχει σε πολλαπλές μεταβολές θερμοκρασίας από -20 °C έως 100 °C • Χωρίς DNase/RNase	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης χωρητικότητας 2 ml, χωρίς νουκλεάση	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Σωληνάρια μικροφυγοκέντρησης χωρητικότητας 1,7 ml, χωρίς νουκλεάση	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Δεξαμενές αντιδραστηρίων χωρίς νουκλεάση (αναλώσιμο δοχείο, 50 ml) (ή ισοδύναμες)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Κωνικά σωληνάρια των 15 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Εξοπλισμός	Προμηθευτής
Κωνικά σωληνάρια των 50 ml	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Συμβατά ρύγχη πιπετών ανθεκτικά σε αερολύματα	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Πλάκες αποθήκευσης 96 βοθρίων, 0,8 ml (πλάκες MIDI)	Fisher Scientific, κωδικός είδους AB-0859 ή ισοδύναμες
Πλάκες PCR 96 βοθρίων, συμβατές με θερμικό κυκλοποιητή, 0,2 ml (βοθρία πολυπροπυλενίου)	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου
Παγωμένο ή ψυχρό μπλοκ	Γενικός προμηθευτής εργαστηρίου

Ρυθμίσεις διαμόρφωσης της συσκευής υπερήχων για κατακερματισμό DNA

Ο κατακερματισμός ή η διάτμηση του DNA επηρεάζει τις επιδόσεις του προσδιορισμού προσδιορίζοντας την κατανομή του μεγέθους του θραύσματος, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την κάλυψη της αλληλούχησης. Αξιολογήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν αρκετές διαμορφώσεις εστιασμένης υπερήχησης για τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) ([Πίνακα 4](#)).

- Ο χρόνος διάτμησης προσαρμόστηκε για μεγιστοποίηση της μέτρησης MEDIAN_EXON_COVERAGE που περιγράφεται στην ενότητα [Ποιοτικός έλεγχος στη σελίδα 90](#). Οι χρόνοι διάτμησης (ανατρέξτε στον [Πίνακα 4](#)) και τα αποτελέσματα MEDIAN_INSERT_SIZE διέφεραν μεταξύ των διαμορφώσεων.
- Οι διαμορφώσεις 1–4 και 6 εξετάστηκαν με γυάλινα σωληνάρια 8 ταινιών. Η διαμόρφωση 5 χρησιμοποίησε ένα γυάλινο σωληνάριο. Οι χωρητικότητες όγκου λυχνίας παρουσιάζονται στον [Πίνακα 4](#).
- Για τη βελτιστοποίηση των διαμορφώσεων 3–6 (μικρότεροι όγκοι υδατόλουτρου) χρησιμοποιήθηκε παλμική κίνηση.
- Οι διαμορφώσεις 3–5 διατμήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες μικρότερου όγκου. Οι χωρητικότητες όγκου σωληναρίου επηρεάζουν τις παραμέτρους διάτμησης.
- Η διαμόρφωση 4 (μορφοτροπέας γραμμής, όγκος υδατόλουτρου μεσαίου μεγέθους, απαερωμένο νερό) χρειάστηκε μεγάλο χρόνο καθυστέρησης παλμού (40 δευτερόλεπτα) για να επιτευχθεί παρόμοιο MEDIAN_EXON_COVERAGE με τη διαμόρφωση 1 και 2 σε ονομαστική είσοδο 40 ng.
- Οι βέλτιστες ρυθμίσεις για τη διαμόρφωση 3 είχαν ως αποτέλεσμα μια ελαφρώς μεγαλύτερη κατανομή μεγέθους θραύσματος σε σύγκριση με τις άλλες διαμορφώσεις (το MEDIAN_INSERT_SIZE ήταν περίπου 5–10 ζεύγη βάσης μεγαλύτερο).
- Οι διαμορφώσεις 3 και 5 χρησιμοποίησαν μη απαερωμένο νερό και τον μικρότερο όγκο υδατόλουτρου.

- Οι διαμορφώσεις 3 και 5 ενώ χρειάστηκαν αυξημένη είσοδο DNA (50 ng για τη διαμόρφωση 3, 60 ng για τη διαμόρφωση 5), προκειμένου να επιτευχθεί παρόμοια MEDIAN_EXON_COVERAGE σε σχέση με τις άλλες 4 διαμορφώσεις, που χρησιμοποίησαν την ονομαστική είσοδο 40 ng.
- Οι διαμορφώσεις 3 και 5 έχουν μεγαλύτερη βλάβη ή/και αποδιάταξη και συνεπώς μειωμένη αποτελεσματική μάζα χρησιμοποιήσιμων μορίων dsDNA για προετοιμασία βιβλιοθήκης.

Φυγοκεντρήστε τα σωληνάρια διάτμησης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ανάκτησης για να διασφαλίσετε την ανάκτηση του καθορισμένου όγκου, καθώς οποιαδήποτε απώλεια υλικού μπορεί να επηρεάσει δυσμενώς τις επιδόσεις.

Πίνακα 4 Αξιολογημένες διαμορφώσεις συσκευής παραγωγής εστιασμένων υπερήχων

Παράμετρος	Διαμόρφωση					
	1	2	3	4	5	6
Μορφοτροπέας	Γραμμή	Σημείο	Σημείο	Γραμμή	Σημείο	Γραμμή
Όγκος λουτρού ύδατος	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 L
Νερό απαερωμένο	Ναι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι
Ψύκτης νερού	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Θερμοκρασία λουτρού ύδατος	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Μέγιστη προσπίπτουσα ισχύς (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% συντελεστή χρήσης	30	10	30	25	20	25
Κύκλοι ανά ριπή	200	200	1000	1000	1000	600
Παλμοί (ριπές 10 δευτερολέπτων)	Όχι	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Χρόνος καθυστέρησης παλμού	Δ/Ι	Δ/Ι	10 s	40 s	10 s	10 s
Χρόνος διάτμησης	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Επεξεργασία δείγματος	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Μέγεθος παρτίδας	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Μέγεθος δείγματος γυάλινου σωληναρίου 8 ταινιών	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Μονό σωληνάριο (50 µl)	130 µl (ή πλάκα 96 microTUBE)
Απομάκρυνση	Δ/Ι	Δ/Ι	Δ/Ι	3 mm Υ στα 20 mm/s	Δ/Ι	1.5 mm Υ στα 10 mm/s
Ισοδύναμο εισόδου DNA (για διάμεση κάλυψη εξονίου)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Ο χρόνος διάτμησης των 200 δευτερολέπτων περιλαμβάνει ριπές των 10 δευτερολέπτων με 20 επαναλήψεις.² Ο χρόνος διάτμησης των 320 δευτερολέπτων περιλαμβάνει ριπές των 10 δευτερολέπτων με 32 επαναλήψεις.

Ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας θερμικού κυκλοποιητή

Ο ρυθμός μεταβολής θερμοκρασίας του θερμικού κυκλοποιητή επηρεάζει τις μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου του προσδιορισμού (χρησιμοποιήσιμοι τόποι MSI, διάμεσος στόχος CNV αριθμού κάδων, διάμεσο μέγεθος ενθέτου (RNA)) καθώς και τις υποστηρικτικές αναγνώσεις για παραλλαγές και συντήξεις ματίσματος. Συνιστάται βελτιστοποίηση του ρυθμού μεταβολής θερμοκρασίας του θερμικού κυκλοποιητή. Για παράδειγμα, ένα δοκιμασμένο μοντέλο προσαρμόστηκε από έναν προεπιλεγμένο (και μέγιστο) ρυθμό μεταβολής θερμοκρασίας 5°C/s σε 3°C/s για να ληφθούν συγκρίσιμα αποτελέσματα με άλλα μοντέλα με χαμηλότερους προεπιλεγμένους ρυθμούς μεταβολής θερμοκρασίας.

Συλλογή, μεταφορά και αποθήκευση δειγμάτων

Ακολουθήστε τις τυπικές διαδικασίες κατά τη συλλογή, τη μεταφορά, την αποθήκευση και την επεξεργασία δειγμάτων.

Απαιτήσεις δειγμάτων

Ιστός FFPE

Ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) απαιτεί 40 ng RNA ή/και 40 ng DNA που εκχυλίζονται από ιστό FFPE. Η χρήση τόσο του RNA όσο και του DNA επιτρέπει την ανάλυση όλων των αναφερόμενων παραλλαγών. Ο ιστός θα πρέπει να μονιμοποιηθεί με τη χρήση μονιμοποιητικού φορμαλίνης κατάλληλου για μοριακές αναλύσεις (για παράδειγμα, 10% ουδέτερο ρυθμισμένο διάλυμα φορμαλίνης). Ο ιστός δεν πρέπει να αποτιτανώνεται. Πριν από την εκτέλεση του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU), το δείγμα ιστού θα πρέπει να εξεταστεί από παθολογοανατόμο για να διασφαλιστεί ότι είναι κατάλληλο για αυτήν την εξέταση. Απαιτείται περιεχόμενο όγκου τουλάχιστον 20% (ανά περιοχή) για την ανίχνευση σωματικών μεταλλάξεων-οδηγών. Η αξιόπιστη ανίχνευση της κατάστασης MSI σε διάφορα δείγματα απαιτεί τουλάχιστον 30% περιεχόμενο όγκου. Εάν ένα δείγμα εξεταστεί με περιεχόμενο όγκου μικρότερο από 30% για να προσδιοριστούν οι εκβάσεις με άλλους τύπους παραλλαγών, ένα αποτέλεσμα MS-Σταθερό μπορεί να είναι αναξιόπιστο. Ένα αποτέλεσμα MSI-High είναι σωστό ανεξάρτητα από το περιεχόμενο του όγκου.

Το περιεχόμενο του όγκου για γονιδιακές ενισχύσεις και παραλλαγές RNA εξαρτάται από την έκταση της ενίσχυσης ή την έκφραση της σύντηξης (ανατρέξτε στην ενότητα [Περιεχόμενο του όγκου στη σελίδα 117](#)).

Για υψηλή πιθανότητα εξαγωγής 40 ng RNA και 40 ng DNA από διάφορους τύπους συμπαγών ιστών, ο συνιστώμενος όγκος ιστού είναι $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Αυτός ο όγκος είναι ισοδύναμος με αθροιστική βιώσιμη περιοχή ιστού $\geq 200 \text{ mm}^2$ χρησιμοποιώντας τομές πάχους 5 μm ή $\geq 100 \text{ mm}^2$ χρησιμοποιώντας τομές πάχους 10 μm . Το αθροιστικό εμβαδόν ιστού είναι το άθροισμα του εμβαδού βιώσιμου ιστού σε όλες τις τομές που υποβάλλονται για εκχύλιση. Για παράδειγμα, αθροιστικό εμβαδόν ιστού 200 mm^2 θα μπορούσε να ληφθεί εκχυλίζοντας τέσσερις τομές 5 μm με εμβαδόν ιστού 50 mm^2 η καθεμία ή πέντε τομές 10 μm με εμβαδόν ιστού 20 mm^2 η καθεμία. Η ιστική νέκρωση μπορεί να μειώσει την ποσότητα παραγωγής νουκλεϊκών οξέων. Για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων, ο ιστός μπορεί να υποβληθεί σε μακροτεμαχισμό για να επιτευχθεί επιθυμητό βιώσιμο περιεχόμενο όγκου.

Η υψηλή ποσότητα νεκρωτικού ιστού ($\geq 23\%$ ανά περιοχή) μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) να ανιχνεύσει γονιδιακές ενισχύσεις και συντήξεις RNA. Εάν οι τομές του δείγματος περιέχουν νέκρωση μεγαλύτερη από 23% στο συνολικό εμβαδόν του ιστού, ο νεκρωτικός ιστός πρέπει να υποβληθεί σε μακροτεμαχισμό. Εάν το εργαστήριο εκτελεί RNA με τον προσδιορισμό, ο ιστός με αιμοσφαιρίνη θα πρέπει να αποφεύγεται ή να ελαχιστοποιείται κατά τη λήψη τομών από το μπλοκ ιστού. Ανατρέξτε στην ενότητα [Παρεμβαλλόμενες ουσίες στη σελίδα 107](#).

Ο τοποθετημένος σε αντικειμενοφόρο πλάκα ιστός FFPE μπορεί να αποθηκευτεί για έως και 28 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκ ί ν οξέ ί ν

- Εκχυλίστε RNA και DNA από δείγματα ιστού FFPE χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα κιτ εκχύλισης. Διαφορές στα κιτ εκχύλισης μπορούν να επηρεάσουν τις επιδόσεις. Ανατρέξτε στην ενότητα [Αξιολόγηση του κιτ εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 105](#).
- Μην αυξάνετε την πρωτεϊνάση K ή το ισοδύναμο ένζυμο κατά τη διάρκεια της εκχύλισης από την τυπική συγκέντρωση που παρέχεται σε ένα κιτ εκχύλισης. Ανατρέξτε στην ενότητα [Παρεμβαλλόμενες ουσίες στη σελίδα 107](#).
- Φυλάσσετε το απόθεμα εκχυλισμένων νουκλεϊκών οξέων ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή του κιτ εκχύλισης.
- Φυλάσσετε το εξαχθέν DNA για έως και 28 ημέρες στους -25°C έως -15°C.
- Φυλάσσετε το εξαχθέν RNA για έως και 28 ημέρες στους -85°C έως -65°C.
- Για να αποφύγετε αλλαγές στη συγκέντρωση με την πάροδο του χρόνου, μετρήστε το DNA και το RNA εντός 28 ημερών από την έναρξη της προετοιμασίας βιβλιοθήκης. Ποσοτικοποιήστε το RNA και το DNA χρησιμοποιώντας μια φθορισμομετρική μέθοδο ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιεί χρωστικές δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων. Η συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων θα πρέπει να είναι ο μέσος όρος τουλάχιστον τριών μετρήσεων.
- Ο προσδιορισμός απαιτεί 40 ng από κάθε δείγμα RNA που παρασκευάζεται σε νερό χωρίς-RNase/DNase (δεν παρέχεται), με τελικό όγκο 8,5 μl (4,7 ng/μl).
- Ο προσδιορισμός απαιτεί 40 ng από κάθε δείγμα gDNA με ελάχιστη συγκέντρωση εκχύλισης 3,33 ng/μl. Η διάτμηση απαιτεί τελικό όγκο 52 μl (0,77 ng/μl) με τουλάχιστον 40 μl TEB (παρέχεται) που χρησιμοποιείται ως αραιωτικό.

Αποθήκευση βιβλιοθηκ ί ν

Αποθηκεύστε τις βιβλιοθήκες σε πλάκες PCR χαμηλής δέσμευσης για 7 έως 32 ημέρες, ανάλογα με τον τύπο της βιβλιοθήκης (Ανατρέξτε στον [Πίνακα 5](#)).

Πίνακα 5 Χρόνοι αποθήκευσης βιβλιοθηκών

Τύπος βιβλιοθήκης	Πλάκα	Αριθμός ημερ ί ν	Θερμοκρασία αποθήκευσης
cDNA	PCF PCR	≤7	-25 °C έως -15 °C
Κατακερματισμένο gDNA	LP PCR	≤7	-25 °C έως -15 °C
Πριν τον εμπλουτισμό	ALS PCR	≤30	-25 °C έως -15 °C

Τύπος βιβλιοθήκης	Πλάκα	Αριθμός ημερών	Θερμοκρασία αποθήκευσης
Μετά τον εμπλουτισμό	ELU2 PCR	≤7	-25 °C έως -15 °C
PCR μετά τον εμπλουτισμό	PL PCR	≤30	-25 °C έως -15 °C
Κανονικοποιημένη	NL PCR	≤ 32	-25 °C έως -15 °C

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Ασφάλεια



Προειδοποίηση

Το συγκεκριμένο σετ αντιδραστηρίων περιέχει δυνητικά επικίνδυνες χημικές ουσίες. Η εισπνοή, η κατάποση και η επαφή με το δέρμα ή τα μάτια μπορεί να προκαλέσουν σημαντική βλάβη. Ο αερισμός θα πρέπει να είναι κατάλληλος για τον χειρισμό επικίνδυνων υλικών στα αντιδραστήρια. Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας, μεταξύ των οποίων εξοπλισμό προστασίας για τα μάτια, γάντια και εργαστηριακή ποδιά, κατάλληλα για τον κίνδυνο έκθεσης. Τα χρησιμοποιημένα αντιδραστήρια πρέπει να αντιμετωπίζονται ως χημικά απόβλητα και να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες περιφερειακούς, εθνικούς και τοπικούς νόμους και κανονισμούς. Για πρόσθετες πληροφορίες σχετικά με το περιβάλλον, την υγεία και την ασφάλεια, ανατρέξτε στο SDS, στην ηλ. διεύθυνση support.illumina.com/sds.html.

- Να χειρίζεστε όλα τα δείγματα σαν να είναι γνωστό ότι είναι μολυσματικά.
- Χρησιμοποιείτε συνήθεις εργαστηριακές προφυλάξεις. Μη χρησιμοποιείτε το στόμα σας για να αναρροφήσετε υγρά στην πιπέτα. Μην τρείτε, πίνετε ή καπνίζετε σε καθορισμένους χώρους εργασίας. Φοράτε γάντια μίας χρήσης και εργαστηριακή ρόμπα κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων προσδιορισμού. Πλένετε τα χέρια σας σχολαστικά μετά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων προσδιορισμού.

Εργαστήριο

- Για την αποφυγή επιμόλυνσης, διευθετήστε το εργαστήριο με ροή εργασιών μίας κατεύθυνσης. Διασφαλίστε ότι στις περιοχές προενίσχυσης και μετά την ενίσχυση υπάρχει ειδικός εξοπλισμός (π.χ. πιπέτες, ρύγχη πιπετών, αναδευτήρας και συσκευή φυγοκέντρωσης). Για να αποτρέψετε τη μεταφορά του προϊόντος ενίσχυσης ή του ανιχνευτή, αποφύγετε την επιστροφή στην περιοχή προενίσχυσης μετά την είσοδο στην περιοχή μετά την ενίσχυση.
- Εκτελέστε τα βήματα ευρετηριασμού PCR και εμπλουτισμού σε μια περιοχή μετά την ενίσχυση για να αποτρέψετε τη μεταφορά του προϊόντος ενίσχυσης.

- Οι διαδικασίες προετοιμασίας της βιβλιοθήκης απαιτούν περιβάλλον χωρίς- RNase/DNase. Απολυμάνετε σχολαστικά τους χώρους εργασίας με καθαριστικό αναστολής- RNase/DNase. Χρησιμοποιείτε πλαστικά τα οποία έχει πιστοποιηθεί ότι δεν περιέχουν DNase, RNase και ανθρώπινο γονιδιωματικό DNA.
- Για τις διαδικασίες μετά την ενίσχυση, καθαρίζετε σχολαστικά τις επιφάνειες εργασίας και τον εξοπλισμό πριν και μετά από κάθε διαδικασία με πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5% (NaOCl). Αφήστε το διάλυμα να έρθει σε επαφή με τις επιφάνειες για 10 λεπτά και κατόπιν σκουπίστε το σχολαστικά με αιθυλική ή ισοπροπυλική αλκοόλη 70%.
- Χρησιμοποιείτε σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης, πλάκες, ρύγχη πιπετών και δεξαμενές χωρίς νουκλεάση.
- Χρησιμοποιείτε βαθμονομημένο εξοπλισμό καθ' όλη τη διάρκεια του προσδιορισμού. Φροντίστε να βαθμονομήσετε τον εξοπλισμό στις ταχύτητες, τις θερμοκρασίες και τους όγκους που καθορίζονται σε αυτό το πρωτόκολλο.
- Χρησιμοποιείτε πιπέτες ακριβείας για να διασφαλίσετε την ακριβή χορήγηση των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων. Βαθμονομείτε τακτικά σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή.
- Χρησιμοποιείτε τις ακόλουθες κατευθυντήριες οδηγίες όταν χρησιμοποιείτε πιπέτες πολλαπλών καναλιών:
 - Μεταφέρετε με πιπέτα τουλάχιστον ≥ 2 μ l.
 - Βεβαιωθείτε ότι τα ρύγχη με φραγμό προστασίας εφαρμόζουν καλά και είναι κατάλληλα για τη μάρκα και το μοντέλο της πιπέτας πολλαπλών καναλιών.
 - Επικολλήστε τα ρύγχη με κυλιόμενη κίνηση για να βεβαιωθείτε ότι όλα τα ρύγχη προσαρτώνται εξίσου καλά.
 - Αναρροφήστε υπό γωνία 90°, με ίση στάθμη όγκου υγρού σε όλα τα ρύγχη.
 - Αναμείξτε όλα τα συστατικά μετά τη χορήγηση πιπετάροντας πάνω-κάτω το μείγμα αντίδρασης.
 - Μετά τη διανομή, βεβαιωθείτε ότι διανέμεται πλήρως υγρό από κάθε ρύγχος.
- Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε τον εξοπλισμό που καθορίζεται για τον προσδιορισμό και ότι η ρύθμιση των προγραμμάτων έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες.
- Οι θερμοκρασίες που αναφέρονται για τον θερμικό κυκλοποιητή και τον επωαστήρα μικροδειγμάτων υποδεικνύουν τη θερμοκρασία αντίδρασης, όχι απαραίτητα την καθορισμένη θερμοκρασία του εξοπλισμού.

Προσδιορισμός

- Αποφύγετε τη διασταυρούμενη μόλυνση.
 - Ακολουθείτε τις σωστές εργαστηριακές πρακτικές κατά τον χειρισμό δειγμάτων και αντιδραστηρίων.
 - Χρησιμοποιείτε φρέσκο αναλώσιμο εργαστηριακό υλικό και νέα ρύγχη πιπετών μεταξύ των δειγμάτων και μεταξύ των αντιδραστηρίων διανομής.
 - Χρησιμοποιείτε ανθεκτικά στο αερόλυμα ρύγχη για τη μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης.

- Χρησιμοποιείτε ροή εργασιών μίας κατεύθυνσης κατά τη μετάβαση από τις περιοχές προενίσχυσης στις περιοχές μετά την ενίσχυση.
- Να χειρίζεστε και να ανοίγετε μόνο έναν εκκινητή ευρετηριασμού κάθε φορά. Επαναπωματίστε κάθε σωληνάριο ευρετηριασμού αμέσως μετά τη χρήση. Στο κιτ παρέχονται επιπλέον πώματα.
- Αλλάζετε γάντια συχνά και κάθε φορά που έρχονται σε επαφή με εκκινητές ή δείγματα ευρετηριασμού.
- Απομακρύνετε τα αχρησιμοποίητα σωληνάρια εκκινητών ευρετηριασμού από την περιοχή εργασίας.
- Μην επιστρέφετε τα αντιδραστήρια σε σωληνάρια αποθέματος μετά τη χρήση με σωληνάρια ταινιών, δοχείο ή δεξαμενή.
- Αναμείξτε τα δείγματα με πιπέτα και φυγοκεντρήστε την πλάκα όταν ενδείκνυται.
- Χρησιμοποιείτε αναδευτήρα μικροπλακών. Μην περιδινείτε τις πλάκες.
- Μην εναλλάσσετε εξαρτήματα του προσδιορισμού από διαφορετικά κιτ αντιδραστηρίων. Οι παρτίδες κιτ αντιδραστηρίων προσδιορίζονται στην επισήμανση του κουτιού του κιτ αντιδραστηρίων και στο δελτίο κύριας παρτίδας.
- Απαιτείται η εφαρμογή ορθών εργαστηριακών πρακτικών για να αποτραπεί η επιμόλυνση των αντιδραστηρίων, των οργάνων, των δειγμάτων και των βιβλιοθηκών από νουκλεάσες και προϊόντα PCR. Η επιμόλυνση από νουκλεάση και προϊόν PCR μπορεί να προκαλέσει ανακριβή και αναξιόπιστα αποτελέσματα.
- Για βέλτιστες επιδόσεις και αποθήκευση του προσδιορισμού απαιτείται ο σωστός τύπος πλάκας. Βεβαιωθείτε ότι ακολουθείτε τις οδηγίες μεταφοράς πλακών που περιγράφονται στις [Οδηγίες χρήσης στη σελίδα 44](#).
- Η μη τήρηση των διαδικασιών όπως περιγράφονται μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα ή σημαντική μείωση της ποιότητας της βιβλιοθήκης.
- Εάν δεν προσδιορίζεται ασφαλές σημείο διακοπής στις [Οδηγίες χρήσης στη σελίδα 44](#), μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα.
- Φυλάσσετε τα αντιδραστήρια ή τα συστατικά του προσδιορισμού στην καθορισμένη θερμοκρασία, σε καθορισμένες περιοχές πριν- και μετά- την ενίσχυση.
- Μην αποθηκεύετε τα αντιδραστήρια σε μονάδα αποθήκευσης με τεχνολογία χωρίς πάγο ή σε ράφια πόρτας ψυγείου.
- Μην καταψύχετε αντιδραστήρια που περιέχουν σφαιρίδια (LNB1, SPB και SMB).
- Μη χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια που δεν έχουν αποθηκευτεί σωστά.
- Μην αποκλίνετε από τις διαδικασίες ανάμειξης και χειρισμού που καθορίζονται για κάθε αντιδραστήριο. Η ανεπαρκής ανάμειξη ή υπερβολική περιδίνηση των αντιδραστηρίων μπορεί να οδηγήσει σε αποτυχημένα αποτελέσματα δείγματος.

- Τα FSM, SSM, ERA1-B και TCB1 μπορεί να έχουν σωματίδια που σχετίζονται με το προϊόν. Ακολουθήστε τις κατευθυντήριες οδηγίες χειρισμού για κάθε συγκεκριμένο αντιδραστήριο. Μετά την εκτέλεση των βημάτων ανάμειξης του FSM και του SSM, τα υπολειπόμενα λευκά σωματίδια που σχετίζονται με το προϊόν δεν θα επηρεάσουν τις επιδόσεις.
- Παρασκευάζετε φρέσκα βασικά μείγματα και απορρίπτετε τον υπόλοιπο όγκο μετά τη χρήση.
- Να προετοιμάζετε πάντοτε φρέσκο διάλυμα αιθανόλης 80% με νερό χωρίς RNase/DNase για τα βήματα πλύσης. Η αιθανόλη μπορεί να απορροφήσει νερό από τον αέρα, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Απορρίψτε την αιθανόλη 80% μετά τη χρήση σύμφωνα με τους τοπικούς, πολιτειακούς ή/και ομοσπονδιακούς κανονισμούς.
- Μεταφέρετε τον καθορισμένο όγκο εκλούσματος. Η μεταφορά λιγότερου από τον καθορισμένο όγκο εκλούσματος κατά τη διάρκεια των βημάτων έκλουσης μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα.
- Χρησιμοποιείτε τις ακόλουθες κατευθυντήριες οδηγίες για τις συσκευές παραγωγής υπερήχων. Βεβαιωθείτε ότι ακολουθείτε τις οδηγίες του κατασκευαστή.
 - Φορτώστε το gDNA στο σωληνάριο της συσκευής παραγωγής υπερήχων αργά για να αποφύγετε τη δημιουργία φουσαλίδων. Η ύπαρξη υπερβολικών φουσαλίδων αέρα ή κενού αέρα στο σωληνάριο διάτμησης μπορεί να οδηγήσει σε ατελή κατακερματισμό.
 - Διανείμετε σε σωληνάρια συσκευής παραγωγής υπερήχων αργά και αποφύγετε την εκτίναξη.
 - Για να αποφύγετε τη μετατόπιση υγρού και την απώλεια δείγματος, μην εισαγάγετε το ρύγχος της πιπέτας στον πυθμένα του σωληναρίου της συσκευής παραγωγής υπερήχων κατά την αφαίρεση του κατακερματισμένου DNA.
- Μην αναρροφάτε με πιπέτα λιγότερα από 2 μl δείγματος.
- Μη χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή αντιδραστηρίων για βήματα που απαιτούν την προσθήκη υλικού λιγότερου των 10 μl σε κάθε βοθρίο δείγματος.
- Χρησιμοποιείτε πιπέτα με λεπτό ρύγχος κατά τη μεταφορά του κατακερματισμένου δείγματος gDNA από τα σωληνάρια της συσκευής παραγωγής υπερήχων στην πλάκα προετοιμασίας βιβλιοθήκης (LP).
- Μη συνδυάζετε προσαρμοστές SUA1 και UMI μεταξύ τους.
- Χρησιμοποιείτε προσαρμοστές SUA1 με δείγματα RNA.
- Χρησιμοποιείτε προσαρμοστές UMI με δείγματα DNA.
- Εκχωρείτε διαφορετικούς εκκινητές ευρετηριασμού σε κάθε δείγμα βιβλιοθήκης για να ταυτοποιήσετε με μοναδικό τρόπο κάθε βιβλιοθήκη όταν ομαδοποιείται για αλληλούχιση σε μία κυψελίδα ροής.
- Μη συνδυάζετε εκκινητές ευρετηριασμού CPxx και UPxx στην ίδια βιβλιοθήκη.
- Τυχόν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις μεταξύ των δειγμάτων και των εκκινητών ευρετηρίου έχουν ως αποτέλεσμα εσφαλμένη αναφορά αποτελεσμάτων λόγω απώλειας θετικής ταυτοποίησης δειγμάτων. Εισαγάγετε αναγνωριστικά δειγμάτων και εκχωρήστε ευρετήρια στο Μονάδα ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) πριν ξεκινήσετε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης. Καταγράψτε τα αναγνωριστικά δειγμάτων, τον ευρετηριασμό και τον προσανατολισμό των βοθρίων της πλάκας ώστε να μπορείτε να ανατρέξετε κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της βιβλιοθήκης.

- Για βιβλιοθήκες που προέρχονται από δείγματα RNA, χρησιμοποιείτε μόνο ευρετήρια UPxx.
- Για βιβλιοθήκες που προέρχονται από δείγματα DNA, χρησιμοποιήστε ευρετήρια UPxx ή ευρετήρια CPxx.
- Αλληλουχία 8 βιβλιοθηκών RNA και 8 βιβλιοθηκών DNA το μέγιστο ανά κυψελίδα ροής. Εκτελέστε αλληλούχηση σε τουλάχιστον τρεις βιβλιοθήκες. Ακολουθήστε τις κατευθυντήριες οδηγίες στην ενότητα [Αριθμός βιβλιοθηκών και επιλογή ευρετηρίων στη σελίδα 39](#).
- Μετά το βήμα δέσμευσης στην ενότητα [Σύλληψη στόχων ένα στη σελίδα 67](#) και την ενότητα [Σύλληψη στόχων δύο στη σελίδα 72](#), μεταβείτε αμέσως στο βήμα πλύσης για να αποτρέψετε την ξήρανση των σφαιριδίων.
- Κατά τη διάρκεια των βημάτων πλύσης, αφαιρέστε όλη την αιθανόλη 80% από τον πυθμένα των βοθρίων. Έχει αποδειχθεί ότι η υπολειπόμενη αιθανόλη επηρεάζει τα αποτελέσματα.
- Για βέλτιστες επιδόσεις του προσδιορισμού, τηρήστε τον καθορισμένο αριθμό πλύσεων που υποδεικνύεται στις [Οδηγίες χρήσης στη σελίδα 44](#).
- Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας [Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών στη σελίδα 79](#), επαναιωρήστε ενδελεχώς το ίζημα σφαιριδίων τη βιβλιοθήκης για να επιτύχετε σταθερή πυκνότητα συστάδας στην κυψελίδα ροής.
- Αναφέρετε αμέσως τυχόν σοβαρά ατυχήματα που σχετίζονται με αυτό το προϊόν στην Illumina και στις αρμόδιες αρχές των κρατών μελών στα οποία είναι εγκατεστημένοι ο χρήστης και ο ασθενής.

Σημειώσεις για τις διαδικασίες

- Η ροή εργασιών του TSO Comprehensive (EU) μπορεί να διεξαχθεί σύμφωνα με το ακόλουθο χρονοδιάγραμμα:
 - Ημέρα 1: Σύνθεση cDNA από δείγματα RNA, κατακερματισμός DNA δειγμάτων gDNA, προετοιμασία βιβλιοθήκης και έναρξη (πρώτου) υβριδισμού κατά τη διάρκεια της νύχτας.
 - Ημέρα 2: Εμπλουτισμός, κανονικοποίηση εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών και φόρτωση βιβλιοθηκών στο όργανο NextSeq 550Dx.Εάν δεν είναι δυνατή η εκτέλεση της ροής εργασιών του TSO Comprehensive (EU) σύμφωνα με αυτό το χρονοδιάγραμμα, προσδιορίζονται αρκετά σημεία ασφαλούς διακοπής σε όλο το πρωτόκολλο. Εάν δεν προσδιορίζεται σημείο ασφαλούς διακοπής στο πρωτόκολλο, μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα.
- Βιβλιοθήκες που προέρχονται από δείγματα RNA και DNA μπορούν να προετοιμαστούν ταυτόχρονα σε ξεχωριστά βοθρία.
- Οι πίνακες παρασκευής βασικού μείγματος περιλαμβάνουν πλεόνασμα όγκου ώστε να διασφαλιστεί ότι υπάρχει επαρκής όγκος για τον αριθμό των δειγμάτων που υποβάλλονται σε επεξεργασία.
- Χρησιμοποιήστε μοριακό νερό χωρίς νουκλεάσες.
- Μετά την προσθήκη του αντιδραστηρίου, εκπλύνετε το ρύγχος αναρροφώντας και διανέμοντας μία φορά στο κατάλληλο βοθρίο της πλάκας, εκτός εάν καθορίζεται κάτι άλλο στη διαδικασία.
- Ως θερμοκρασία δωματίου ορίζονται οι 15 °C έως 30 °C.

- Τα αντιδραστήρια, τα δείγματα και οι βιβλιοθήκες πρέπει να διατηρούνται κρύα σε ορισμένα βήματα των οδηγιών χρήσης. Αυτό ορίζεται ως διατήρηση σε πάγο ή ισοδύναμο.

Προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή

- Προγραμματίστε τα προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή στον εξοπλισμό προενίσχυσης και μετά την ενίσχυση πριν από την έναρξη του πρωτοκόλλου.
- Βεβαιωθείτε ότι οι πλάκες PCR εφαρμόζουν καλά στον θερμικό κυκλοποιητή.
- Χρησιμοποιείτε πλάκες που συνιστώνται από τον κατασκευαστή του θερμικού κυκλοποιητή.

Στεγανοποίηση και αφαίρεση στεγανοποίησης της πλάκας

- Να στεγανοποιείτε πάντοτε τις πλάκες με νέο αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών. Μην επαναχρησιμοποιείτε τα στεγανοποιητικά.
- Για να στεγανοποιήσετε την πλάκα, εφαρμόστε με ασφάλεια το αυτοκόλλητο κάλυμμα στην πλάκα με σφήνα ή κύλινδρο στεγανοποίησης.
- Στεγανοποιείτε πάντα την πλάκα 96 βοθρίων με αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών πριν εκτελέσετε τα παρακάτω βήματα στο πρωτόκολλο.
 - Βήματα ανακίνησης πλάκας
 - Βήματα φυγοκέντρωσης
 - Βήματα θερμικής κυκλοποίησης
 - Υβριδισμοί
 - Μακροχρόνια αποθήκευση
- Βεβαιωθείτε ότι τα άκρα και τα βοθρία είναι στεγανοποιημένα για να μειωθεί ο κίνδυνος διασταυρούμενης μόλυνσης και εξάτμισης.
- Τοποθετήστε την πλάκα σε μια επίπεδη επιφάνεια προτού αφαιρέσετε τη στεγανοποίηση με αργές κινήσεις.
- Πριν από την αφαίρεση της στεγανοποίησης, εάν παρατηρήσετε υγρό ή συμπύκνωση υδρατμών στη στεγανοποίηση ή στα πλευρικά τοιχώματα των βοθρίων της πλάκας, φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
- Χρησιμοποιείτε αυτοκόλλητα στεγανοποιητικά πλακών που είναι αποτελεσματικά σε θερμοκρασία -20 °C έως 100 °C και κατάλληλα για πλάκες PCR με προστατευτικό περίβλημα ή προστατευτικό ημιπερίβλημα.

Εξοπλισμός

- Βεβαιωθείτε ότι το προσωπικό του εργαστηρίου είναι εξοικειωμένο με τις οδηγίες του κατασκευαστή σχετικά με τη λειτουργία και τη συντήρηση όλου του εξοπλισμού πριν από την έναρξη του προσδιορισμού.

Τύπος πλάκας και μεταφορές πλακίον

- Για βέλτιστες επιδόσεις και αποθήκευση του προσδιορισμού απαιτείται ο σωστός τύπος πλάκας.
- Κατά τη μεταφορά όγκων μεταξύ πλακών, μεταφέρετε τον καθορισμένο όγκο από κάθε βοθρίο μιας πλάκας στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας προορισμού.
- Κατά τη μεταφορά δειγμάτων μεταξύ ταινιών σωληναρίων ή πλακών μπορούν να χρησιμοποιηθούν πιπέτες πολλαπλών καναλιών.
- Ακολουθήστε τις παρακάτω οδηγίες κατά την ανακίνηση των πλακών.
 - Χρησιμοποιήστε αναδευτήρα πλακών για να ανακινήσετε τις πλάκες. Μην περιδινείτε τις πλάκες.
 - Ανακινήστε τις πλάκες PCR στις 1.200 σ.α.λ.
 - Ανακινήστε τις πλάκες MIDI στις 1.800 σ.α.λ.
 - Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για να βεβαιωθείτε ότι ο αναδευτήρας πλακών συγκρατεί την πλάκα με ασφάλεια.

Φυγοκέντρωση

- Όταν οι οδηγίες στο πρωτόκολλο υποδεικνύουν φυγοκέντρωση για σύντομο διάστημα, φυγοκεντρήστε στα $280 \times g$ για 1 λεπτό.
- Εάν παρατηρήσετε υγρό στη στεγανοποίηση ή στις πλευρές ενός βοθρίου, φυγοκεντρήστε την πλάκα στα $280 \times g$ για 1 λεπτό.

Χειρισμός αντιδραστηρίων

- Επαναπωματίστε καλά όλα τα σωληνάρια αντιδραστηρίων αμέσως μετά τη χρήση για να περιορίσετε την εξάτμιση και να αποτρέψετε την επιμόλυνση.
- Επιστρέψτε τα αντιδραστήρια στην καθορισμένη θερμοκρασία αποθήκευσης όταν δεν χρειάζονται πλέον για μια διαδικασία.
- Ακολουθήστε την προετοιμασία αντιδραστηρίων που προηγείται κάθε ενότητας διαδικασίας των [Οδηγίες χρήσης στη σελίδα 44](#).
- Φροντίστε να παρασκευάσετε τον απαιτούμενο όγκο βασικού μείγματος, μείγματος έκλουσης και αιθανόλης 80% για τον αριθμό των δειγμάτων που υποβάλλετε σε επεξεργασία.
- Οι όγκοι που παρέχονται στους πίνακες βασικού μείγματος και διαλύματος περιέχουν πλεονάσμα. Οι υπολογισμοί του όγκου πλεονάσματος έχουν ως εξής.
 - **Πίνακα 14**
 - Όγκος FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{αριθμός δειγμάτων} + \text{μαρτύρων}) \times (1,25)$.
 - Όγκος RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{αριθμός δειγμάτων} + \text{μαρτύρων}) \times (1,25)$.
 - **Πίνακα 21**
 - Όγκος ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{αριθμός βιβλιοθηκών}) \times (1,20)$.
 - Όγκος ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{αριθμός βιβλιοθηκών}) \times (1,20)$.

- **Πίνακα 29**
 - Όγκος EE2 = (20,9 μl) x (αριθμός βιβλιοθηκών) x (1,364).
 - Όγκος HP3 = (1,1 μl) x (αριθμός βιβλιοθηκών) x (1,364).
- **Πίνακα 30**
 - Όγκος EE2 = (20,9 μl) x (αριθμός βιβλιοθηκών) x (1,364).
 - Όγκος HP3 = (1,1 μl) x (αριθμός βιβλιοθηκών) x (1,364).
- **Πίνακα 36**
 - Όγκος LNA1 = (38,1 μl) x (αριθμός βιβλιοθηκών) x (2,0).
 - Όγκος LNB1 = (6,9 μl) x (αριθμός βιβλιοθηκών) x (2,0).
- **Πίνακα 37**
 - Όγκος EE2 = (30,4 μl) x (αριθμός βιβλιοθηκών) x (1,25).
 - Όγκος HP3 = (1,6 μl) x (αριθμός βιβλιοθηκών) x (1,25).

Σετ προσαρμοστίν

- Ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) περιλαμβάνει προσαρμοστές SUA1 και UMI.
- Οι προσαρμοστές SUA1 προορίζονται για χρήση με δείγματα RNA. Δεν προορίζονται για χρήση με δείγματα DNA.
- Οι προσαρμοστές UMI προορίζονται για χρήση με δείγματα DNA. Δεν προορίζονται για χρήση με δείγματα RNA.

Χειρισμός σφαιριδίων

- Τρεις τύποι σφαιριδίων περιλαμβάνονται στον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) (SPB, SMB και LNB1). Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείται ο σωστός τύπος σφαιριδίων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας.
- Εκτελέστε τον σωστό αριθμό πλύσεων για κάθε τύπο σφαιριδίων.
- Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
- Αναμείξτε τα σφαιρίδια για 1 λεπτό πριν από τη χρήση για να διασφαλίσετε ομοιογένεια.

- Χρησιμοποιείτε τις ακόλουθες κατευθυντήριες οδηγίες κατά την ανάμειξη σφαιριδίων με πιπέτα:
 - Χρησιμοποιήστε κατάλληλη πιπέτα και κατάλληλο μέγεθος ρύγχους για τον όγκο που αναμιγνύετε.
 - Προσαρμόστε τη ρύθμιση όγκου στο 50–75% περίπου του όγκου δείγματος.
 - Πιπετάρετε αργά χωρίς να απελευθερώσετε το έμβολο.
 - Αποφύγετε την εκτίναξη υλικού και την εισαγωγή φυσαλίδων.
 - Τοποθετήστε το ρύγχος της πιπέτας πάνω από το ίζημα και διανείμετε απευθείας μέσα στο ίζημα για να απελευθερώσετε τα σφαιρίδια από το βοθρίο ή το σωληνάριο.
 - Βεβαιωθείτε ότι το ίζημα σφαιριδίων είναι πλήρως μέσα στο διάλυμα. Το διάλυμα θα πρέπει να έχει σκούρο καφέ χρώμα και ομοιογενή σύσταση.
 - Αξιολογήστε εάν υπάρχει ίζημα σφαιριδίων. Αναρροφήστε προσεκτικά όλο το διάλυμα σφαιριδίων του βοθρίου μέσα στο ρύγχος και κοιτάξτε τον πυθμένα των βοθρίων.
- Εάν αναρροφηθούν σφαιρίδια στα ρύγχη των πιπετών κατά τη διάρκεια των βημάτων μαγνητικού διαχωρισμού, επαναδιανείμετε τα σφαιρίδια στο βοθρίο της πλάκας στη μαγνητική βάση. Περιμένετε μέχρι να γίνει διαυγές το υγρό (περίπου 2 λεπτά) πριν μεταβείτε στο επόμενο βήμα της διαδικασίας.
- Κατά το πλύσιμο των σφαιριδίων:
 - Χρησιμοποιήστε τη συνιστώμενη μαγνητική βάση για την πλάκα.
 - Διανείμετε υγρό απευθείας επάνω στο ίζημα σφαιριδίων έτσι ώστε να διαβραχούν τα σφαιρίδια στο πλάι των βοθρίων.
 - Διατηρήστε την πλάκα στη μαγνητική βάση έως ότου η διαδικασία απαιτήσει την αφαίρεσή της.
 - Μην ανακινείτε την πλάκα ενόσω βρίσκεται στη μαγνητική βάση.
 - Ενόσω βρίσκεται στη μαγνητική βάση, μην διαταράσσετε το ίζημα σφαιριδίων.
- Κατά το πλύσιμο σφαιριδίων ή την αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού, γείρετε τα ρύγχη πιπετών στον πυθμένα των βοθρίων για να αποφύγετε τη δημιουργία υποπίεσης και να τραβήξετε το διάλυμα μέσα στα φίλτρα των ρυγχών των πιπετών.

Αριθμός βιβλιοθηκών και επιλογή ευρετηρίων

Πριν από τη ρύθμιση της εκτέλεσης, προγραμματίστε τον αριθμό βιβλιοθηκών δειγμάτων και ευρετηρίων δειγμάτων για την εκτέλεση της αλληλούχισης. Οι ακόλουθες κατευθυντήριες οδηγίες για τον αριθμό δειγμάτων περιλαμβάνουν θετικούς μάρτυρες, αλλά αποκλείουν αρνητικούς μάρτυρες/μάρτυρες χωρίς πρότυπο (NTC). Οι NTC πρέπει να προστεθούν στην προγραμματισμένη εκτέλεση ως πρόσθετο δείγμα.

Για το TSO Comprehensive (EU), ακολουθήστε τις κατευθυντήριες οδηγίες στον [Πίνακα 6](#) και [Πίνακα 7](#) για να προσδιορίσετε τον αριθμό βιβλιοθηκών RNA ή/και DNA που θα υποβληθούν σε αλληλούχιση σε μία κυψελίδα ροής. Ανατρέξτε στον [Πίνακα 6](#) εάν εκτελείτε αλληλούχιση σε βιβλιοθήκες RNA ή DNA ξεχωριστά. Ανατρέξτε στον [Πίνακα 7](#) εάν εκτελείτε αλληλούχιση σε βιβλιοθήκες RNA και DNA στην ίδια κυψελίδα ροής.

Πίνακα 6 Αλληλούχιση βιβλιοθηκών RNA ή DNA

Τύπος βιβλιοθήκης	Ελάχιστο*	Μέγιστο*
Μόνο RNA	3	16
Μόνο DNA	3	8

* Οι NTC δεν συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα.

Πίνακα 7 Αλληλούχιση σε βιβλιοθήκες RNA και DNA στην ίδια κυψελίδα ροής

Τύπος βιβλιοθήκης	Ελάχιστο*	Μέγιστο*
RNA	3	8
DNA	3	8

* Οι NTC δεν συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα.

Για βέλτιστη χρήση των αντιδραστηρίων κατά την αλληλούχιση βιβλιοθηκών DNA και RNA με TSO Comprehensive (EU) στο όργανο NextSeq 550Dx, υποβάλλετε σε αλληλούχιση 8 βιβλιοθήκες RNA και 8 βιβλιοθήκες DNA ανά κυψελίδα ροής.

Οι εκκινητές ευρετηρίου ταυτοποιούν με μοναδικό τρόπο κάθε δείγμα, έτσι ώστε οι βιβλιοθήκες να μπορούν να ομαδοποιηθούν για αλληλούχιση σε μία κυψελίδα ροής. Οι συμβατοί συνδυασμοί ευρετηρίου εμφανίζονται στην οθόνη Create Run (Δημιουργία εκτέλεσης) κατά τη ρύθμιση εκτέλεσης στο Μονάδα ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας βιβλιοθήκης, προσθέστε τον εκκινητή ευρετηρίου σε κάθε βιβλιοθήκη δειγμάτων. **Χρησιμοποιήστε διαφορετικό μείγμα εκκινητών ευρετηρίου για κάθε βιβλιοθήκη δειγμάτων.**

Βεβαιωθείτε ότι οι εκκινητές ευρετηρίου που χρησιμοποιείτε με τα δείγματα αντιστοιχούν στα ευρετήρια που επιλέγετε για ανάλυση με τη Μονάδα ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). **Τυχόν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις προκαλούν εσφαλμένη αναφορά αποτελεσμάτων λόγω απώλειας θετικής ταυτοποίησης του δείγματος.**

Υπάρχουν δύο τύποι ευρετηρίων στον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU).

- **Ευρετήρια UPxx** — Χρησιμοποιείτε τα ευρετήρια UPxx για βιβλιοθήκες που προέρχονται από δείγματα RNA ή DNA.
- **Ευρετήρια CPxx** — Χρησιμοποιείτε τα ευρετήρια CPxx για βιβλιοθήκες που προέρχονται από δείγματα DNA. Μη χρησιμοποιείτε τα ευρετήρια CPxx για βιβλιοθήκες που προέρχονται από RNA ή εάν υποβάλλετε σε αλληλούχιση μόνο τρεις βιβλιοθήκες DNA συνολικά.

Κατά την αλληλούχιση μόνο τριών βιβλιοθηκών, ισχύουν οι ακόλουθες απαιτήσεις:

- Οι βιβλιοθήκες πρέπει να είναι όλες DNA ή όλες RNA.
- Μη χρησιμοποιείτε σετ ευρετηρίων CPxx.
- Απαιτείται ένα από τα παρακάτω σετ ευρετηρίων UPxx για την εξασφάλιση επαρκούς ποικιλομορφίας:
 - UP01, UP02 και UP03
 - UP04, UP05 και UP06
 - UP07, UP08 και UP09
 - UP10, UP11 και UP12

Για παράδειγμα, στην πρώτη βιβλιοθήκη εκχωρείται UP01, στη δεύτερη βιβλιοθήκη UP02 και στην τρίτη βιβλιοθήκη UP03.

Μάρτυρες TruSight Oncology

Το TSO Comprehensive (EU) απαιτεί Μάρτυρες TruSight Oncology, οι οποίοι περιλαμβάνουν τον μάρτυρα DNA TruSight Oncology και τον μάρτυρα TruSight OncologyRNA ως θετικούς μάρτυρες. Συμπεριλάβετε τον μάρτυρα DNA TruSight Oncology για κάθε εκτέλεση αλληλούχισης DNA και τον μάρτυρα RNA TruSight Oncology για κάθε εκτέλεση αλληλούχισης RNA εντός ενός δεδομένου συμβάντος προετοιμασίας βιβλιοθήκης (συμπεριλάβετε επίσης μάρτυρες για συνδυασμένες εκτελέσεις DNA και RNA). Για κάθε προγραμματισμένη εκτέλεση αλληλούχισης προετοιμάζεται ένας μοναδικός θετικός μάρτυρας. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στον Ένθετο συσκευασίας TruSight Oncology Controls (αρ. εγγράφου 200009919).

Η ποσότητα εισόδου θετικού μάρτυρα είναι 40 ng για DNA και RNA.

Συμπεριλάβετε τον κατάλληλο NTC σε κάθε συμβάν προετοιμασίας βιβλιοθήκης RNA και κάθε συμβάν προετοιμασίας βιβλιοθήκης DNA. Ο NTC υποβάλλεται σε αλληλούχιση επανειλημμένα εντός ενός συμβάντος προετοιμασίας βιβλιοθήκης. Ακολουθήστε αυτές τις κατευθυντήριες οδηγίες για τους Μάρτυρες TruSight Oncology:

- Προετοιμάστε βιβλιοθήκες από θετικούς μάρτυρες και μάρτυρες χωρίς πρότυπο πανομοιότυπους με τα δείγματα.
- Χρησιμοποιήστε TEB για τον DNA NTC.
- Χρησιμοποιήστε νερό χωρίς DNase/RNase για τον RNA NTC.
- Οι θετικοί μάρτυρες περιλαμβάνονται στη μέγιστη απαίτηση βιβλιοθήκης.
- Οι NTC δεν περιλαμβάνονται στην ελάχιστη απαίτηση βιβλιοθήκης.
- Χρησιμοποιήστε δείκτες UP για το NTC όταν εκτελείτε αλληλούχιση μόνο 3 βιβλιοθηκών.
- Επειδή ο NTC υποβάλλεται σε αλληλούχιση επανειλημμένα, τα ευρετήρια που επιλέγονται για αυτόν τον μάρτυρα δεν μπορούν να επαναληφθούν στο συμβάν προετοιμασίας βιβλιοθήκης.

Οι παρακάτω πίνακες παρουσιάζουν παραδείγματα διατάξεων πλακών για προετοιμασία βιβλιοθήκης. Κάθε αριθμημένη στήλη αντιπροσωπεύει μία μεμονωμένη εκτέλεση αλληλούχισης. Κατά τη συνδυαστική αλληλούχιση βιβλιοθηκών DNA και RNA, κάθε αντίστοιχο σύνολο στηλών αντιπροσωπεύει μία μεμονωμένη εκτέλεση αλληλούχισης (για παράδειγμα, στήλη 1 και στήλη 7). Ο NTC υποβάλλεται σε αλληλούχιση για κάθε στήλη ή σύνολο στηλών.

Πίνακα 8 Συμβάν προετοιμασίας βιβλιοθήκης μίας εκτέλεσης που περιλαμβάνει έξι δείγματα ασθενών

	1	2	3	4	5	6	7
A	Θετικός μάρτυρας DNA	κενό	κενό	κενό	κενό	κενό	Θετικός μάρτυρας RNA
B	DNA 1	κενό	κενό	κενό	κενό	κενό	RNA 1
C	DNA 2	κενό	κενό	κενό	κενό	κενό	RNA 2
D	DNA 3	κενό	κενό	κενό	κενό	κενό	RNA 3
E	DNA 4	κενό	κενό	κενό	κενό	κενό	RNA 4
F	DNA 5	κενό	κενό	κενό	κενό	κενό	RNA 5
G	DNA 6	κενό	κενό	κενό	κενό	κενό	RNA 6
H	DNA NTC	κενό	κενό	κενό	κενό	κενό	RNA NTC

Πίνακα 9 Συμβάν προετοιμασίας βιβλιοθήκης τριών εκτελέσεων που περιλαμβάνει 20 δείγματα ασθενών

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

Οδηγίες χρήσης

Μια επισκόπηση της ροής εργασιών TSO Comprehensive (EU) παρουσιάζεται στην [Εικόνα 1](#) και στην [Εικόνα 2](#).

Ροή εργασιών προετοιμασίας βιβλιοθηκών

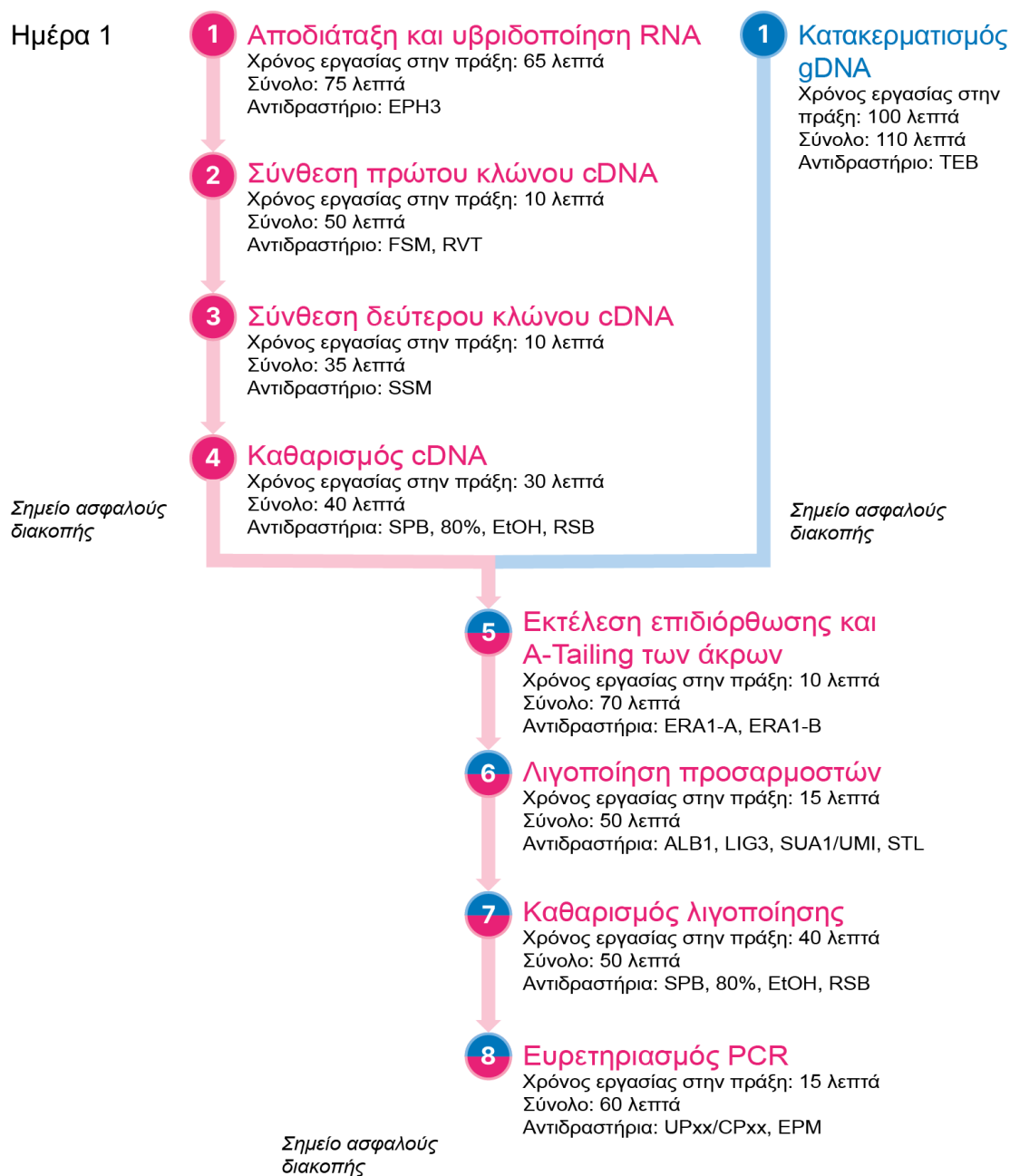
Η [Εικόνα 1](#) απεικονίζει τη ροή εργασιών προετοιμασίας βιβλιοθηκών για το TSO Comprehensive (EU).

Βιβλιοθήκες από δείγματα RNA και DNA μπορούν να προετοιμαστούν ταυτόχρονα σε ξεχωριστά βοηθία. Οι θετικοί μάρτυρες και οι μάρτυρες χωρίς πρότυπο υποβάλλονται σε επεξεργασία με τον ίδιο τρόπο όπως τα δείγματα. Τα σημεία ασφαλούς διακοπής επισημαίνονται μεταξύ των βημάτων.

Πριν από την έναρξη του πρωτοκόλλου, εισαγάγετε τις πληροφορίες εκτέλεσης και δείγματος στο Μονάδα ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Ανατρέξτε στο *Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200008661).

Εικόνα 1 Ροή εργασιών TSO Comprehensive (EU) (Μέρος 1)

Ημέρα 1



● cDNA

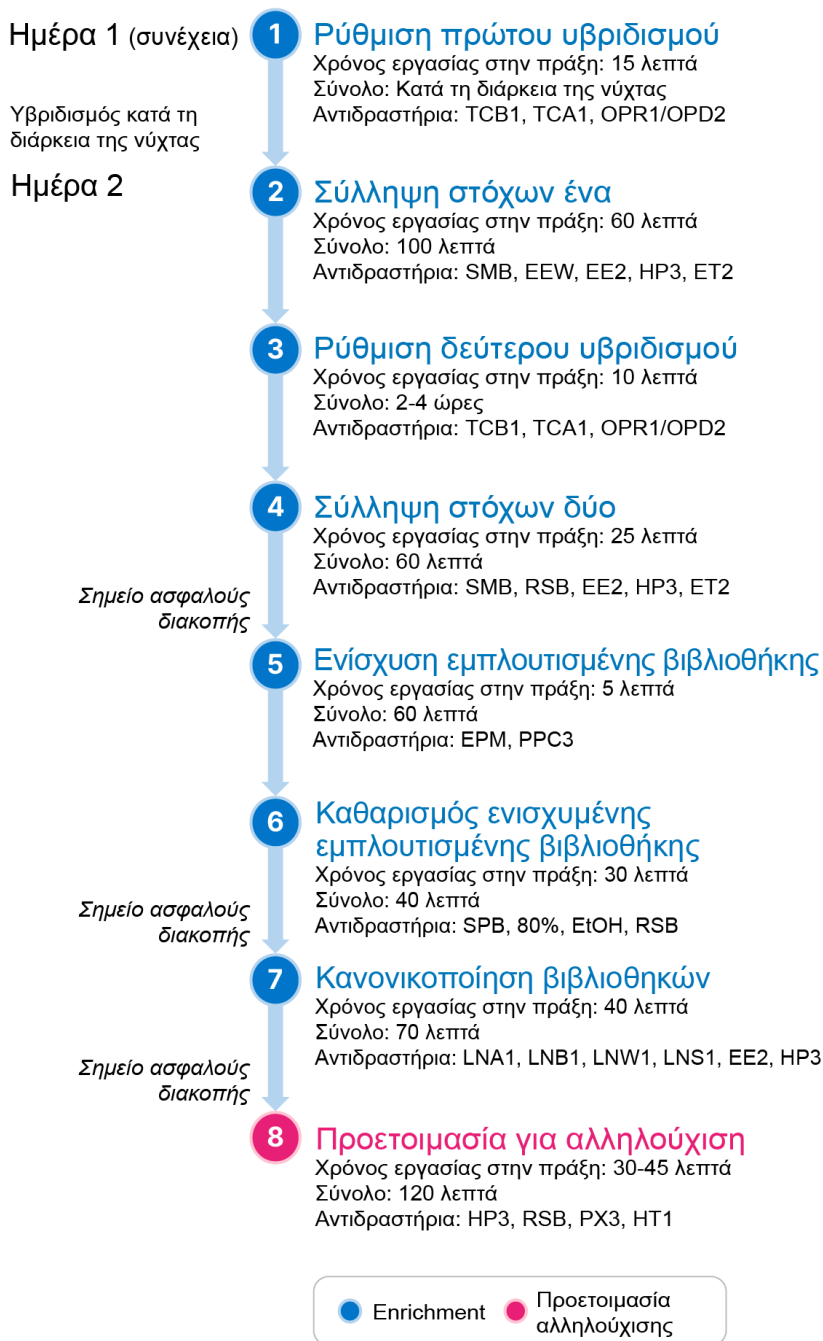
● Διάτμηση DNA

* Οι χρόνοι εργασίας στην πράξη και οι συνολικοί χρόνοι δίνονται κατά προσέγγιση.

Ροή εργασίας εν εμπλουτισμού

Η **Εικόνα 2** απεικονίζει τη ροή εργασιών εμπλουτισμού για το TSO Comprehensive (EU). Τα σημεία ασφαλούς διακοπής επισημαίνονται μεταξύ των βημάτων.

Εικόνα 2 Ροή εργασιών TSO Comprehensive (EU) (Μέρος 2)



Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών

Πριν από την έναρξη του προσδιορισμού, αποθηκεύστε τα ακόλουθα προγράμματα στους θερμικούς κυκλοποιητές πριν και μετά την ενίσχυση.

Πίνακα 10 Προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή προενίσχυσης

Βήμα διαδικασίας	Όνομα προγράμματος	Θερμοκρασία καπακιού	Όγκος αντίδρασης	Παράμετροι θερμικού κυκλοποιητή
Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA	LQ-RNA	100 °C	17 μl	65 °C για 5 λεπτά 4 °C για 1 λεπτό - Διατηρήστε στους 4°C
Σύνθεση μονόκλωνου cDNA	1stSS	100 °C	25 μl	25 °C για 10 λεπτά 42 °C για 15 λεπτά 70 °C για 15 λεπτά 4°C για 1 λεπτό - Διατηρήστε στους 4°C
Σύνθεση δίκλωνου cDNA	2ndSS	30 °C	50 μl	16 °C για 25 λεπτά 4°C για 1 λεπτό - Διατηρήστε στους 4°C

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Εάν η θερμοκρασία του καπακιού για το 2ndSS δεν μπορεί να ρυθμιστεί στους 30 °C, απενεργοποιήστε την επιλογή προθέρμανσης καπακιού.

Πίνακα 11 Προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή μετά την ενίσχυση

Βήμα διαδικασίας	Όνομα προγράμματος	Θερμοκρασία καπακιού	Όγκος αντίδρασης	Παράμετροι θερμικού κυκλοποιητή
Ευετηριασμός PCR	I-PCR	100 °C	50 μl	98 °C για 30 δευτερόλεπτα 15 κύκλοι: 98 °C για 10 δευτερόλεπτα 60 °C για 30 δευτερόλεπτα 72 °C για 30 δευτερόλεπτα 72 °C για 5 λεπτά - Διατηρήστε στους 10 °C

Βήμα διαδικασίας	Όνομα προγράμματος	Θερμοκρασία καπακιού	Όγκος αντίδρασης	Παράμετροι θερμικού κυκλοποιητή
Εκτέλεση πρώτου υβριδισμού	HYB1	100 °C	50 μl	• 95 °C για 10 λεπτά • 85 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα • 75 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα • 65 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα • Αναμονή στους 57 °C για 8 έως 24 ώρες
Εκτέλεση δεύτερου υβριδισμού	HYB2	100 °C	50 μl	• 95 °C για 10 λεπτά • 85 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα • 75 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα • 65 °C για 2 λεπτά και 30 δευτερόλεπτα • Αναμονή στους 57 °C για 1,5 έως 4 ώρες
Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης	EL-PCR	100 °C	50 μl	• 98 °C για 30 δευτερόλεπτα • 18 κύκλοι: • 98 °C για 10 δευτερόλεπτα • 60 °C για 30 δευτερόλεπτα • 72 °C για 30 δευτερόλεπτα • 72 °C για 5 λεπτά • Διατηρήστε στους 10 °C

Προετοιμασία για το πρωτόκολλο

Αυτή η προετοιμασία απαιτείται για την εκτέλεση των βημάτων του πρωτοκόλλου που οδηγούν στο επόμενο ασφαλές σημείο διακοπής.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Όλες οι διαδικασίες στη ροή εργασιών απαιτούν περιβάλλον χωρίς RNase/DNase.

1. Απολυμάνετε ενδελεχώς τους χώρους εργασίας με καθαριστικό που αναστέλλει την RNase/DNase.
2. Βεβαιωθείτε ότι έχουν ρυθμιστεί τα προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή μετά την ενίσχυση. Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).

3. Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή για να ρυθμίσετε τη συσκευή παραγωγής υπερήχων.
4. Εάν υποβάλλετε σε επεξεργασία μόνο δείγματα DNA, μεταβείτε απευθείας στην ενότητα [Κατακερματισμός gDNA στη σελίδα 54](#).
5. Αφαιρέστε τους μάρτυρες RNA από τον χώρο αποθήκευσης.
6. Αφαιρέστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίων από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακα 12 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης RNA (Κωδικός είδους 20031127)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ-τοκόλλου
EPH3	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA
FSM	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύνθεση μονόκλωνου cDNA
RVT	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε το κρύο.	Σύνθεση μονόκλωνου cDNA
SSM	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύνθεση δίκλωνου cDNA

Πίνακα 13 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031119)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ-τοκόλλου
SPB (ετικέτα ανοιχτού πράσινου χρώματος)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός cDNA
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός cDNA

Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA

Αυτή η διαδικασία αποδιατάσσει το κεκαθαρμένο RNA και το προετοιμάζει με τυχαία εξαμερή για την προετοιμασία της σύνθεσης του cDNA.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - EPH3 — Βάλτε το στην άκρη.
 - FSM — Περιδινήστε για ανάμειξη. Φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμειξη.
Το αντιδραστήριο μπορεί να περιέχει λευκά σωματίδια που σχετίζονται με το προϊόν. Δεν απαιτείται καμία ενέργεια από τον χρήστη. Δεν υπάρχει επίδραση στις επιδόσεις του προϊόντος.

- RVT — Φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμειξη. Διατηρήστε το κρύο.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ Το RVT είναι ένα παχύρρευστο διάλυμα. Ελαχιστοποιήστε τον σχηματισμό φυσαλίδων κατά το πιπετάρισμα.

2. Σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης, συνδυάστε τους παρακάτω όγκους για να προετοιμάσετε βασικό μείγμα FSM + RVT.

Πίνακα 14 Βασικό μείγμα FSM + RVT*

Συστατικό βασικού μείγματος	4 Βιβλιοθήκες (μl)	8 Βιβλιοθήκες (μl)	16 Βιβλιοθήκες (μl)	24 Βιβλιοθήκες (μl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Ανατρέξτε στην ενότητα [Χειρισμός αντιδραστηρίων στη σελίδα 37](#) για τους υπολογισμούς.

3. Πιπετάρετε 10 φορές για ανάμειξη.
4. Διατηρήστε το βασικό μείγμα FSM + RVT κρύο μέχρι τη [Σύνθεση μονόκλωνου cDNA στη σελίδα 51](#).

Διαδικασία

1. Διατηρείτε τα δείγματα εκχυλισμένου RNA και τους μάρτυρες RNA κρύα κατά την απόψυξη. Υποβάλλετε σε επεξεργασία τους μάρτυρες RNA ως δείγματα για το υπόλοιπο του πρωτοκόλλου.
2. Διατηρείτε το RNA κρύο όταν δεν χρησιμοποιείται. Ανατρέξτε στην ενότητα [Απαιτήσεις δειγμάτων στη σελίδα 29](#) για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.
3. Πιπετάρετε κάθε δείγμα RNA 10 φορές για ανάμειξη.
4. Χρησιμοποιήστε νερό χωρίς RNase/DNase για να παρασκευάσετε 40 ng από κάθε δείγμα RNA σε τελικό όγκο 8,5 μl (4,7 ng/μl).
Για μάρτυρες RNA, χρησιμοποιήστε τη συγκέντρωση που παρέχεται στην επισήμανση του σωληναρίου.
5. Επισημάνετε μια νέα πλάκα PCR 96 βοθρίων CF (Θραύσματα cDNA).
6. Προσθέστε 8,5 μl από κάθε δείγμα RNA σε ένα μοναδικό βοθρίο της πλάκας CF PCR.
7. Βεβαιωθείτε ότι η διάταξη και τα ευρετήρια της πλάκας δείγματος για κάθε δείγμα αντιστοιχούν στην εκτέλεση που έχει προγραμματιστεί κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης Μονάδα ανάλυσης TSO Comprehensive (EU).
8. Περιδινήστε το EPH3 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
9. Προσθέστε 8,5 μl EPH3 σε κάθε βοθρίο δείγματος.
10. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα CF PCR.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.

11. Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 1 λεπτό.
12. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
13. Τοποθετήστε στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα LQ-RNA.
Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).
14. Όταν τα δείγματα φτάσουν τους 4°C, κρατήστε τα για 1 λεπτό. Μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα.

Σύνθεση μονόκλωνου cDNA

Αυτή η διαδικασία μεταγράφει αντίστροφα τα θραύσματα RNA που έχουν προετοιμαστεί με τυχαία εξαμερή στο μονοκλωνικό cDNA με χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης.

Διαδικασία

1. Αφαιρέστε την πλάκα CF PCR από τον θερμικό κυκλοποιητή.
2. Πιπετάρετε 10 φορές για να αναμίξετε το βασικό μείγμα FSM + RVT. Βεβαιωθείτε ότι το μείγμα FSM + RVT είναι απολύτως ομοιογενές.
3. Προσθέστε 8 μl βασικού μείγματος FSM + RVT σε κάθε βοηθίο δείγματος.
4. Πιπετάρετε 10 φορές για ανάμειξη.
5. Απορρίψτε το υπόλοιπο βασικό μείγμα FSM + RVT.
6. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα CF PCR.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
7. Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 1 λεπτό.
8. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
9. Τοποθετήστε σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα 1stSS.
Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).
10. Όταν τα δείγματα φτάσουν στους 4 °C, μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα.
Τα μονοκλωνικά δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους 4 °C για έως και 5 λεπτά.

Σύνθεση δίκλωνου cDNA

Αυτή η διαδικασία καταργεί το πρότυπο RNA και συνθέτει δίκλωνο cDNA.

Προετοιμασία

1. Προετοιμασία SSM:
 - a. Αναστρέψτε 10 φορές για ανάμειξη.

- b. Φυγοκεντρήστε σύντομα. Το αντιδραστήριο μπορεί να περιέχει λευκά σωματίδια που σχετίζονται με το προϊόν. Δεν απαιτείται καμία ενέργεια. Δεν υπάρχει επίδραση στις επιδόσεις του προϊόντος.

Διαδικασία

1. Αφαιρέστε την πλάκα CF PCR από τον θερμικό κυκλοποιητή.
2. Προσθέστε 25 µl SSM σε κάθε βοθρίο δείγματος.
3. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα CF PCR. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
4. Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 1 λεπτό.
5. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
6. Τοποθετήστε σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα 2ndSS. Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).
7. Όταν τα δείγματα φτάσουν στους 4 °C, περιμένετε για 1 λεπτό και μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα.

Καθαρισμός cDNA

Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιεί SPB για τον καθαρισμό του cDNA από συστατικά ανεπιθύμητης αντίδρασης. Τα σφαιρίδια πλένονται δύο φορές με φρέσκια EtOH 80%. Το cDNA εκλούεται με RSB.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - SPB — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
 - RSB — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
2. Παρασκευάστε φρέσκο EtOH 80% σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml ή των 50 ml ως εξής.

Πίνακα 15 Παρασκευάστε φρέσκο EtOH 80%

Αντιδραστήριο	4 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες
100% EtOH, καθαρό	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Περιδινήστε φρέσκο EtOH 80% για ανάμειξη.
4. Επισημάνετε νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων BIND1 (Δέσμευση cDNA).
5. Καλύψτε την και αφήστε την στην άκρη.
6. Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

Διαδικασία

Δέσμευση

1. Αφαιρέστε την πλάκα CF PCR από τον θερμικό κυκλοποιητή.
2. Περιδινήστε το SPB για 1 λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
3. Προσθέστε αμέσως 90 μl SPB σε κάθε βοθρίο της βιβλιοθήκης της πλάκας BIND1 MIDI.
Εάν χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή του SPB, συμπεριλάβετε συντελεστή πλεονάσματος 1,15 κατά την κλασματοποίηση επαρκούς υλικού ανά δείγμα. Απορρίψτε τυχόν υπολειπόμενο υλικό μετά την προσθήκη του SPB σε κάθε βοθρίο δείγματος.
4. Μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο (50 μl) κάθε δείγματος από την πλάκα CF PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας BIND1 MIDI.
5. Απορρίψτε την άδεια πλάκα PCR CF.
6. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BIND1 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
7. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
8. Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
9. Τοποθετήστε την πλάκα BIND1 MIDI σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
10. Κρατήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο δείγματος.

Έκπλυση

1. Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
 - a. Διατηρήστε την πλάκα BIND1 MIDI στη μαγνητική βάση και προσθέστε 200 μl φρέσκο EtOH 80% σε κάθε βοθρίο.
 - b. Περιμένετε 30 δευτερόλεπτα.
 - c. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο δείγματος.
2. Πλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
3. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα με λεπτά άκρα για να αφαιρέσετε το υπολειπόμενο EtOH από κάθε βοθρίο.
4. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο EtOH 80%.

Έκλουση

1. Αφαιρέστε την πλάκα BIND1 MIDI από τη μαγνητική βάση.
2. Αναστρέψτε ή περιδινήστε το RSB για ανάμειξη.
3. Προσθέστε 22 μl RSB σε κάθε βοθρίο δείγματος.
4. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BIND1 MIDI.

Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.

5. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
6. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
7. Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
8. Επισημάνετε νέα πλάκα PCF MIDI 96 βοηθίων (Κεκαθαρμένα θραύσματα cDNA).
Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία στο [ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ](#) στη σελίδα 54, χρησιμοποιήστε πλάκα PCR.
9. Μεταφέρετε 20 μl εκλούσματος από κάθε βοηθίο δείγματος της πλάκας BIND1 MIDI στο αντίστοιχο βοηθίο της πλάκας PCF.
10. Απορρίψτε την άδεια πλάκα BIND1 MIDI.
11. Προσθέστε 30 μl RSB σε κάθε βοηθίο δείγματος της πλάκας PCF.
12. Πιπετάρετε για ανάμειξη 10 φορές.
13. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCF και διατηρήστε την κρύα.
14. Επιστρέψτε τα EPH3, FSM, RVT και SSM στον χώρο αποθήκευσης.
15. Εάν υποβάλλετε σε επεξεργασία δείγματα που προέρχονται μόνο από RNA (cDNA) και δεν διακόπτετε τη διαδικασία στο ασφαλές σημείο διακοπής, μεταβείτε στο βήμα [Εκτέλεση επιδιόρθωσης και A-Tailing των άκρων](#) στη σελίδα 58.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, φυγοκεντρήστε την πλάκα PCR PCF στα 280 × g για 1 λεπτό και φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως και 7 ημέρες.

Προετοιμασία για το πρωτόκολλο

Αυτή η προετοιμασία απαιτείται για την εκτέλεση των βημάτων του πρωτοκόλλου που οδηγούν στο επόμενο ασφαλές σημείο διακοπής.

1. Αφαιρέστε τους μάρτυρες DNA από τον χώρο αποθήκευσης.
2. Αφαιρέστε το σωληνάριο αντιδραστηρίου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακα 16 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Ψύξη) (Κωδικός είδους 20031119)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτόκολλου
TEB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Κατακερματισμός gDNA

Κατακερματισμός gDNA

Αυτή η διαδικασία κατακερματίζει το gDNA και δημιουργεί θραύσματα dsDNA με προεξοχές 3' ή 5'.

Προετοιμασία

1. Τηρείτε τις συστάσεις της ενότητας [Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30](#) για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων.
2. Προετοιμασία TEB — Αναστρέψτε ή περιδινήστε για ανάμειξη.

Διαδικασία

Προετοιμασία της πλάκας

Επιλέξτε μία από τις ακόλουθες επιλογές για να προετοιμάσετε την πλάκα.

- Επεξεργασία των δειγμάτων gDNA ταυτόχρονα με τα δείγματα cDNA στην πλάκα MIDI PCF.
 - a. Επισημάνετε την πλάκα MIDI PCF LP (Προετοιμασία βιβλιοθήκης).
 - b. Διατηρήστε κρύα και αφήστε τα στην άκρη για χρήση στο βήμα [Μεταφορά κατακερματισμένου DNA στη σελίδα 56](#).
- Επεξεργασία των δειγμάτων gDNA ταυτόχρονα με τα δείγματα cDNA με κατεψυγμένη την πλάκα PCR PCF.
 - a. Αποψύξτε την πλάκα PCR PCF σε θερμοκρασία δωματίου.
 - b. Φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
 - c. Πιπετάρετε 10 φορές για ανάμειξη.
 - d. Επισημάνετε μια νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων LP (Προετοιμασία βιβλιοθήκης).
 - e. Μεταφέρετε ολόκληρη την ποσότητα των 50 μl κάθε δείγματος από την πλάκα PCR PCF στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας MIDI LP.
 - f. Απορρίψτε την πλάκα PCR PCF.
 - g. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών και διατηρήστε τις κρύες μέχρι να εκτελέσετε το βήμα [Μεταφορά κατακερματισμένου DNA στη σελίδα 56](#).
- Επεξεργασία μόνο δειγμάτων gDNA.
 - a. Επισημάνετε μια νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων LP (Προετοιμασία βιβλιοθήκης).
Εάν σταματήσετε στο βήμα [ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ στη σελίδα 57](#), χρησιμοποιήστε πλάκα PCR.
 - b. Καλύψτε και αφήστε τα στην άκρη για χρήση στο βήμα [Μεταφορά κατακερματισμένου DNA στη σελίδα 56](#).

Αραίωση gDNA

1. Αποψύξτε τα δείγματα gDNA και τους μάρτυρες DNA σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Πιπετάρετε κάθε δείγμα gDNA 10 φορές για ανάμειξη.
3. Φυγοκεντρήστε για λίγο το σωληνάριο για να συλλέξετε τα σταγονίδια.
4. Αναστρέψτε ή περιδινήστε το TEB για ανάμειξη.

5. Χρησιμοποιήστε TEB για την παρασκευή κάθε δείγματος gDNA με τελικό όγκο 52 μl. Ανατρέξτε στον παρακάτω πίνακα για τις ποσότητες εισόδου και τις ελάχιστες συγκεντρώσεις με βάση τον τύπο δείγματος.
 - Ο προσδιορισμός απαιτεί ελάχιστη συγκέντρωση εκχύλισης για να εξασφαλίσει τουλάχιστον 40 μl TEB του όγκου των 52 μl.
 - Για μάρτυρες DNA, χρησιμοποιήστε τη συγκέντρωση που παρέχεται στην επισήμανση του σωληναρίου.
 - Για να αποφευχθεί η απώλεια δείγματος, μην μεταφέρετε με πιπέτα λιγότερο από 2 μl δείγματος σε αυτήν την αραιώση.

Τύπος δείγματος	Ποσότητα εισόδου (ng)	Ελάχιστη συγκέντρωση (ng/μl)
FFPE	40	3,33
Μάρτυρας	40	Ανατρέξτε στην επισήμανση του σωληναρίου

Θραύσμα

1. Προσθέστε 52 μl από κάθε δείγμα gDNA σε ξεχωριστό βοθρίο του σωληναρίου της συσκευής παραγωγής υπερήχων.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Φορτώστε το gDNA στο σωληνάριο αργά, φροντίζοντας να μην υπάρχουν κενά αέρα στον πυθμένα του σωληναρίου. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στον [Προσδιορισμός στη σελίδα 32](#) και στις οδηγίες του κατασκευαστή.

2. Καταγράψτε τον προσανατολισμό της ταινίας.
3. Κατακερματίστε το gDNA σε θραύσματα με συσκευή παραγωγής υπερήχων.

Μεταφορά κατακερματισμένου DNA

1. Βεβαιωθείτε ότι η διάταξη των πλακών δειγμάτων και τα ευρετήρια για κάθε δείγμα αντιστοιχούν στην εκτέλεση που επιλέγετε για ανάλυση με τη Μονάδα ανάλυσης TSO Comprehensive (EU).
2. Ακολουθήστε τις οδηγίες του κατασκευαστή της συσκευής παραγωγής υπερήχων για να ανακτήσετε το δείγμα.
Για ορισμένους τύπους σωληναρίων συσκευών παραγωγής υπερήχων, απαιτείται φυγοκέντρηση για τη συνένωση του δείγματος στο σωληνάριο.
3. Για κάθε κατακερματισμένο δείγμα gDNA, χρησιμοποιήστε πιπέτα με λεπτά ρύγχη για να πραγματοποιήσετε τρεις μεταφορές των 16,7 μl σε κενό βοθρίο της πλάκας MIDI LP.
4. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα MIDI LP.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, εφαρμόστε αυτοκόλλητη στεγανοποίηση πλακών στην πλάκα LP PCR και φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό. Αποθηκεύσετε σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως και 7 ημέρες.

Προετοιμασία για το πρωτόκολλο

Αυτή η προετοιμασία απαιτείται για την εκτέλεση των βημάτων του πρωτοκόλλου που οδηγούν στο επόμενο ασφαλές σημείο διακοπής.

Μετά την ενίσχυση, βεβαιωθείτε ότι έχουν ρυθμιστεί τα προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή. Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).

1. Ετοιμάστε ένα δοχείο πάγου ή ισοδύναμο.
2. Αφαιρέστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίων από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακα 17 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Κατάψυξη) Box (Κωδικός είδους 20031118)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτόκολλου
ERA1-A	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε το κρύο.	Εκτέλεση επιδιόρθωσης και A-Tailing των άκρων
ERA1-B	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Εκτέλεση επιδιόρθωσης και A-Tailing των άκρων
ALB1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
LIG3	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε το κρύο.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
SUA1 (μπλε πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
UMI (λευκό πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
STL	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Λιγοποίηση προσαρμοστών
EPM	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε το κρύο.	Ευρετηριασμός PCR

Πίνακα 18 TruSight Oncology Comp Προετοιμασία βιβλιοθήκης (Ψύξη) Box (Κωδικός είδους 20031119)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ-τοκόλλου
SPB (ετικέτα ανοιχτού πράσινου χρώματος)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός λιγοποίησης
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός λιγοποίησης

Πίνακα 19 TruSight Oncology Comp Εκκινητές ευρετηρίου UP Box (Κωδικός είδους 20031120)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ-τοκόλλου
UPxx	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε τα κατάλληλα σωληνάρια εκκινητών ευρετηρίου ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Ευρετηριασμός PCR

Πίνακα 20 TruSight Oncology Comp Εκκινητές ευρετηρίου CP Box (Κωδικός είδους 20031126)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ-τοκόλλου
CPxx	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε τα κατάλληλα σωληνάρια εκκινητών ευρετηρίου ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Ευρετηριασμός PCR

Εκτέλεση επιδιόρθωσης και A-Tailing των άκρων

Αυτή η διαδικασία μετατρέπει τις προεξοχές που προκύπτουν από τον κατακερματισμό σε άκρα με προεξοχές ουράς A, χρησιμοποιώντας βασικό μείγμα επιδιόρθωσης και A-Tailing των άκρων (ERA1).

Η δραστηριότητα εξωνουκλεάσης 3' έως 5' αυτού του μείγματος αφαιρεί τις 3' προεξοχές και η δραστηριότητα πολυμεράσης 5' έως 3' γεμίζει τις 5' προεξοχές. Στα 3' άκρα προστίθεται A ουρά κατά τη διάρκεια αυτής της αντίδρασης για να αποτραπεί η μεταξύ τους λιγοποίηση κατά τη διάρκεια της αντίδρασης της λιγοποίησης με προσαρμοστή.

Προετοιμασία

1. Προθερμάνετε δύο επωαστήρες μικροδειγμάτων με ένθετα θερμαντικών συσκευών MIDI ως εξής.
 - Προθερμάνετε έναν επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 30 °C.
 - Προθερμάνετε έναν επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 72 °C.

2. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.

- ERA1-A — Φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμειξη. Διατηρήστε το ψυχρό.
- ERA1-B — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Επιθεωρήστε για ιζήματα. Εάν υπάρχουν, θερμάνετε το σωληνάριο στους 37 °C και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμειξη έως ότου διαλυθούν τα ιζήματα.

3. Παρασκευάστε το βασικό μείγμα ERA1 σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.

Πίνακα 21 Βασικό μείγμα ERA1*

Συστατικό βασικού μείγματος	4 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
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

* Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Ανατρέξτε στην ενότητα [Χειρισμός αντιδραστηρίων στη σελίδα 37](#) για τους υπολογισμούς.

4. Πιπετάρετε αργά 10 φορές, για να διασφαλίσετε ομοιογένεια και κατόπιν φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Διατηρήστε το βασικό μείγμα ERA1 κρύο.

5. Επιλέξτε μία από τις ακόλουθες επιλογές για να προετοιμάσετε την πλάκα:

- Εάν τα δείγματα βρίσκονται σε πλάκα MIDI, προετοιμάστε ως εξής.
 - Επισημάνετε εκ νέου την πλάκα LP2 MIDI (Προετοιμασία βιβλιοθήκης 2).
 - Εάν ορισμένα δείγματα βρίσκονται σε ξεχωριστές πλάκες MIDI, μετακινήστε όλα τα δείγματα σε ξεχωριστά βοθρία της ίδιας πλάκας MIDI σύμφωνα με τη διάταξη πλάκας.
- Εάν η πλάκα έχει καταψυχθεί, προετοιμάστε την ως εξής.
 - Αποψύξτε την πλάκα PCF PCR ή την πλάκα LP PCR σε θερμοκρασία δωματίου.
 - Φυγοκεντρήστε την πλάκα στα 280 × g για 1 λεπτό.
 - Πιπετάρετε 10 φορές για ανάμειξη.
 - Επισημάνετε μια νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων LP2 (Προετοιμασία βιβλιοθήκης 2).
 - Μεταφέρετε ολόκληρη την ποσότητα των 50 μl κάθε δείγματος από την πλάκα PCF PCR ή την πλάκα LP PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας LP2 MIDI.
 - Απορρίψτε την πλάκα PCR PCF ή την πλάκα PCR LP.

Διαδικασία

1. Προσθέστε 10 μl βασικού μείγματος ERA1 σε κάθε βοθρίο δείγματος στην πλάκα LP2 MIDI.
2. Απορρίψτε το υπόλοιπο βασικό μείγμα ERA1.
3. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα LP2 MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.

4. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
5. Επώαστε στον προθερμασμένο επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 30 °C για 30 λεπτά.
6. Μεταφέρετε αμέσως σε έναν δεύτερο προθερμασμένο επωαστήρα μικροδειγμάτων.
7. Επώαστε στους 72 °C για 20 λεπτά.
8. Διατηρήστε την πλάκα LP2 MIDI κρύα για 5 λεπτά.

Λιγοποίηση προσαρμοστ **ί ν**

Αυτή η διαδικασία συνδέει προσαρμοστές στα άκρα των θραυσμάτων cDNA ή/και gDNA.

Ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) περιλαμβάνει προσαρμοστές SUA1 και UMI.

- Χρησιμοποιήστε προσαρμοστές SUA1 με δείγματα RNA.
- Χρησιμοποιήστε προσαρμοστές UMI με δείγματα DNA.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - ALB1 — Περιδινήστε για ανάμειξη επί 10 δευτερόλεπτα τουλάχιστον και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - LIG3 — Φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα και, στη συνέχεια, πιπετάρετε για ανάμειξη. Διατηρήστε το κρύο.
 - SUA1 — Περιδινήστε για ανάμειξη επί 10 δευτερόλεπτα τουλάχιστον και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - UMI — Περιδινήστε για ανάμειξη επί 10 δευτερόλεπτα τουλάχιστον και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - STL — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.

Διαδικασία

1. Αφαιρέστε την πλάκα LP2 MIDI από τον πάγο ή ισοδύναμο.
2. Προσθέστε 60 μl ALB1 σε κάθε βοθρίο δείγματος της πλάκας LP2 MIDI. Το ALB1 είναι ένα παχύρρευστο διάλυμα. Πιπετάρετε αργά για να αποφύγετε τον σχηματισμό φυσαλίδων.
3. Προσθέστε 5 μl LIG3 σε κάθε βοθρίο δείγματος.
4. Προσθέστε προσαρμογείς ως εξής.

Μη συνδυάζετε διαφορετικούς τύπους προσαρμοστών μεταξύ τους.

- **[Βοθρία δείγματ **ί ν** RNA]** — Προσθέστε 10 μl SUA1 (μπλε πώμα) σε κάθε δείγμα που προέρχεται από RNA.
- **[Βοθρία δείγματ **ί ν** DNA]** — Προσθέστε 10 μl UMI (λευκό πώμα) σε κάθε δείγμα που προέρχεται από DNA.

- Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα LP2 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
- Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
- Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
- Περιδινήστε το STL για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
- Προσθέστε 5 μl STL σε κάθε βοηθίο δείγματος της πλάκας LP2 MIDI.
- Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα LP2 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
- Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.

Καθαρισμός λιγοποίησης

Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιεί SPB για τον καθαρισμό λιγοποιημένων με προσαρμοστές θραυσμάτων cDNA ή gDNA και αφαιρεί τα ανεπιθύμητα προϊόντα. Τα σφαιρίδια πλένονται δύο φορές με φρέσκια αιθανόλη 80%. Τα δείγματα που είναι λιγοποιημένα με προσαρμοστές εκλούονται με RSB.

Προετοιμασία

- Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - SPB — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
 - RSB — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- Παρασκευάστε φρέσκο EtOH 80% σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml ή 50 ml.

Πίνακα 22 Παρασκευάστε φρέσκια αιθανόλη 80%

Αντιδραστήριο	4 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
100% EtOH, καθαρή	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 μl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Περιδινήστε φρέσκο EtOH 80% για ανάμειξη.
- Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

Διαδικασία

Δέσμευση

- Περιδινήστε το SPB για 1 λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
- Προσθέστε αμέσως 112 μl SPB σε κάθε βοηθίο δείγματος της πλάκας LP2 MIDI.

Εάν χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή του SPB, συμπεριλάβετε συντελεστή πλεονάσματος 1,15 κατά την κλασματοποίηση επαρκούς υλικού ανά δείγμα. Απορρίψτε τυχόν υπολειπόμενο υλικό μετά την προσθήκη του SPB σε κάθε βοθρίο δείγματος.

3. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα LP2 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
4. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
5. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Τοποθετήστε την πλάκα LP2 MIDI στη μαγνητική βάση για 10 λεπτά.
7. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο δείγματος.

Έκπλυση

1. Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
 - a. Διατηρήστε την πλάκα LP2 MIDI στη μαγνητική βάση και προσθέστε 200 μl φρέσκη EtOH 80% σε κάθε βοθρίο δείγματος.
 - b. Περιμένετε 30 δευτερόλεπτα.
 - c. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο δείγματος.
2. Εκπλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
3. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα με λεπτά άκρα για να αφαιρέσετε το υπολειπόμενο EtOH από κάθε βοθρίο.
4. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο EtOH 80%.

Έκλουση

1. Αφαιρέστε την πλάκα LP2 MIDI από τη μαγνητική βάση.
2. Αναστρέψτε ή περιδινήστε το RSB για ανάμειξη.
3. Προσθέστε 27,5 μl RSB σε κάθε βοθρίο δείγματος.
4. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα LP2 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
5. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
6. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
7. Τοποθετήστε την πλάκα LP2 MIDI σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
8. Επισημάνετε μια νέα πλάκα PCR 96 βοθρίων LS (Δείγματα βιβλιοθήκης).
9. Μεταφέρετε 25 μl από κάθε έκλουσμα από την πλάκα LP2 MIDI στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας LS PCR.
10. Απορρίψτε την άδεια πλάκα LP2 MIDI.

Ευρετηριασμός PCR

Σε αυτό το βήμα, θραύσματα βιβλιοθήκης ενισχύονται με τη χρήση εκκινητών που προσθέτουν αλληλουχίες ευρετηρίου για πολυπλεξία δειγμάτων. Το προκύπτον προϊόν περιέχει την πλήρη βιβλιοθήκη των θραυσμάτων cDNA ή/και DNA που περιβάλλεται από προσαρμοστές που απαιτούνται για τη δημιουργία συστάδων.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - EPM—Διατηρήστε το ψυχρό.
 - UPxx — Περιδινήστε για ανάμειξη και φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Το UPxx είναι ο εκκινητής ευρετηρίου που έχει επιλεγεί στην οθόνη Create Run (Δημιουργία εκτέλεσης) στο λογισμικό Local Run Manager κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης.
 - CPxx — Περιδινήστε για ανάμειξη και φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Το CPxx είναι ο εκκινητής ευρετηρίου που έχει επιλεγεί στην οθόνη Create Run (Δημιουργία εκτέλεσης) στο λογισμικό Local Run Manager κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης.
2. Βεβαιωθείτε ότι τα ευρετήρια για κάθε δείγμα αντιστοιχούν στην εκτέλεση που έχει προγραμματιστεί στο Μονάδα ανάλυσης TSO Comprehensive (EU) κατά τη ρύθμιση της εκτέλεσης. Βεβαιωθείτε ότι ακολουθείτε τις οδηγίες σχετικά με την επιλογή ευρετηρίου στην ενότητα [Αριθμός βιβλιοθηκών και επιλογή ευρετηρίων στη σελίδα 39](#).



ΠΡΟΣΟΧΗ

Τυχόν εσφαλμένες αντιστοιχίσεις μεταξύ των δειγμάτων και των εκκινητών ευρετηρίου έχουν ως αποτέλεσμα εσφαλμένη αναφορά αποτελεσμάτων λόγω απώλειας θετικής ταυτοποίησης δειγμάτων.

Διαδικασία

1. Προσθέστε 5 μl του κατάλληλου εκκινητή ευρετηρίου (UPxx ή CPxx) στο αντίστοιχο βοηθίο δείγματος στην πλάκα LS PCR σύμφωνα με τα επιλεγμένα ευρετήρια.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Να χειρίζεστε και να ανοίγετε μόνο ένα σωληνάριο εκκινητή ευρετηρίου κάθε φορά. Επαναπωματίζετε κάθε σωληνάριο ευρετηρίου με νέο πώμα αμέσως μετά τη χρήση. Μη συνδυάζετε εκκινητές ευρετηρίου μεταξύ τους.

2. Περιδινήστε το EPM για ανάμειξη για 5 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
3. Προσθέστε 20 μl EPM σε κάθε βοηθίο δείγματος.
4. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR LS. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.

5. Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 1 λεπτό.
6. Επιστρέψτε τα αντιδραστήρια προενίσχυσης στον χώρο αποθήκευσης.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Εκτελέστε όλα τα επόμενα βήματα σε περιοχή μετά την ενίσχυση για να αποτρέψετε τη μεταφορά προϊόντος ενίσχυσης.

7. Φυγοκεντρήστε την πλάκα LS PCR στα 280 × g για 1 λεπτό.
8. Τοποθετήστε την στον θερμικό κυκλοποιητή μετά την ενίσχυση και εκτελέστε το πρόγραμμα I-PCR. Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#). Εάν συνεχίσετε με τη [Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού στη σελίδα 65](#), ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης για τα αντιδραστήρια στην ενότητα Βήματα για την προετοιμασία του πρωτοκόλλου.
9. Αφού ολοκληρωθεί το πρόγραμμα I-PCR, φυγοκεντρήστε την πλάκα LS PCR στα 280 × g για 1 λεπτό.
10. Επιστημάνετε εκ νέου την πλάκα ALS (Δείγματα ενισχυμένης βιβλιοθήκης).

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, αποθηκεύστε την πλάκα PCR ALS σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 30 ημέρες.

Προετοιμασία για το πρ^οτόκολλο

Αυτή η προετοιμασία απαιτείται για την εκτέλεση των βημάτων του πρωτοκόλλου που οδηγούν στον υβριδισμό κατά τη διάρκεια της νύχτας.

1. Μετά την ενίσχυση, βεβαιωθείτε ότι έχουν ρυθμιστεί τα προγράμματα θερμικού κυκλοποιητή. Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).
2. Αφαιρέστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίων από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακα 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) Box (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρ ^ο τόκολλου
TCB1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού

Πίνακα 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) Box (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρ ^ο τόκολλου
TCA1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού

Πίνακα 25 TruSight Oncology Comp Σετ περιεχομένου Box (Κωδικός είδους 20031122)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρ ^ο τόκολλου
OPR1 (κόκκινο πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού
OPD2 (λευκό πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού

Ρύθμιση πρ^οτού υβριδισμού

Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, μια δεξαμενή ολιγονουκλεοτιδίων υβριδίζεται σε βιβλιοθήκες cDNA και μια δεξαμενή ολιγονουκλεοτιδίων υβριδίζεται σε βιβλιοθήκες gDNA που προετοιμάζονται στο βήμα [Ευρετηριασμός PCR στη σελίδα 63](#). Ο εμπλουτισμός των στοχευόμενων περιοχών απαιτεί δύο βήματα υβριδισμού. Στον πρώτο υβριδισμό, τα ολιγονουκλεοτίδια υβριδίζονται σε βιβλιοθήκες cDNA ή/και gDNA κατά τη διάρκεια της νύχτας (8 ώρες έως 24 ώρες).

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - TCB1 — Θερμάνετε το σωληνάριο στους 37 °C για 5 λεπτά. Περιδινήστε για ανάμειξη επί 10 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - TCA1 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - OPR1 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

- OPD2 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
2. Εάν η πλάκα ALS PCR αποθηκεύτηκε, αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό. Πιπετάρετε για ανάμειξη.
 3. Επισημάνετε μια νέα πλάκα PCR 96 βοθρίων HYB1 (Υβριδοποίηση 1).

Διαδικασία

1. Μεταφέρετε 20 μl από κάθε βιβλιοθήκη cDNA ή/και gDNA από την πλάκα ALS PCR στο αντίστοιχο βοθρίο στην πλάκα HYB1 PCR.
2. Εφαρμόστε το αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR ALS και αφήστε την στην άκρη. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
3. Επιθεωρήστε το TCB1 για ιζήματα. Εάν υπάρχουν, θερμάνετε ξανά το σωληνάριο και περιδινήστε το σωληνάριο μέχρι να διαλυθούν οι κρύσταλλοι.
4. Προσθέστε 15 μl TCB1 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα PCR HYB1.
5. Προσθέστε 10 μl TCA1 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα PCR HYB1.
6. Προσθέστε ανιχνευτές.

Μη συνδυάζετε διαφορετικούς τύπους ανιχνευτών μεταξύ τους. Προσθέστε μόνο ένα σετ ανιχνευτών ανά βοθρίο.

- **[Βοθρία βιβλιοθήκης RNA]** — Προσθέστε 5 μl OPR1 (κόκκινο πώμα) σε κάθε βιβλιοθήκη που προέρχεται από RNA.
 - **[Βοθρία βιβλιοθήκης DNA]**—Προσθέστε 5 μl OPD2 (λευκό πώμα) σε κάθε βιβλιοθήκη που προέρχεται από DNA.
7. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR HYB1. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
 8. Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
 9. Τοποθετήστε στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα HYB1. Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).
 10. Υβριδοποιήστε στους 57 °C για τουλάχιστον 8 ώρες έως το πολύ 24 ώρες.
 11. Επιστρέψτε τα αντιδραστήρια υβριδισμού στον χώρο αποθήκευσης.
 12. Φυλάσσετε την πλάκα PCR ALS σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 30 ημέρες.

Προετοιμασία για το πρωτόκολλο

Αυτή η προετοιμασία απαιτείται για την εκτέλεση των βημάτων του πρωτοκόλλου που οδηγούν στο επόμενο ασφαλές σημείο διακοπής.

Στην αρχή της ημέρας 2, αφαιρέστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίου από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακα 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) Box (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ τοκόλλου
SMB (ετικέτα σκούρου μπλε χρώματος)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα Σύλληψη στόχων δύο
ET2	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα Σύλληψη στόχων δύο
HP3	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα Σύλληψη στόχων δύο Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
TCB1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων δύο Καθαρισμός ενισχυμένης εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

Πίνακα 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) Box (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ τοκόλλου
EE2	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα Σύλληψη στόχων δύο Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
EEW	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Σύλληψη στόχων ένα
TCA1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού

Πίνακα 28 TruSight Oncology Comp Σετ περιεχομένου Box (Κωδικός είδους 20031122)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ τοκόλλου
OPR1 (κόκκινο πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού
OPD2 (λευκό πώμα)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού

Σύλληψη στόχων ένα

Αυτό το βήμα χρησιμοποιεί SMB για τη σύλληψη ανιχνευτών υβριδισμένων στις στοχευόμενες περιοχές ενδιαφέροντος. Τα σφαιρίδια πλένονται τρεις φορές με EEW. Οι εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες εκλούνται με τη χρήση φρέσκου μείγματος έκλουσης EE2 + HP3 και εξουδετερώνονται με ET2.

Προετοιμασία

1. Προθερμάνετε έναν επωαστήρα μικροδειγμάτων με ένθετο θερμαντικής συσκευής MIDI στους 57 °C.
2. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - EEW — Περιδινήστε για ανάμειξη για 1 λεπτό.
 - EE2 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - HP3 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - SMB — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε το **SMB**, όχι το SPB για αυτήν τη διαδικασία.
 - ET2—Αφήστε στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
3. Παρασκευάστε φρέσκο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.

Πίνακα 29 Μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 για σύλληψη στόχων ένα*

Συστατικό μείγματος έκλουσης	4 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
EE2	114 μl	228 μl	456 μl	684 μl	1.368 μl
HP3	6 μl	12 μl	24 μl	36 μl	72 μl

* Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Ανατρέξτε στην ενότητα [Χειρισμός αντιδραστηρίων στη σελίδα 37](#) για τους υπολογισμούς.

4. Περιδινήστε το μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη για το βήμα [Έκλυση στη σελίδα 70](#).
5. Επιστημάνετε μια νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων CAP1 (Σύλληψη 1).
6. Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

Διαδικασία

Δέσμευση

1. Αφαιρέστε την πλάκα HYB1 PCR από τον θερμικό κυκλοποιητή.
2. Φυγοκεντρήστε την πλάκα HYB1 PCR στα 280 × g για 1 λεπτό.
3. Περιδινήστε το SMB για 1 λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
Εάν υπάρχει ίζημα ή ίζημα σφαιριδίων, βεβαιωθείτε ότι φθάνετε σε θερμοκρασία δωματίου, αναρροφήστε με πιπέτα πάνω-κάτω για να απελευθερώσετε το ίζημα και κατόπιν αναμείξτε σε αναδευτήρα τύπου vortex για να το επαναιωρήσετε.
4. Προσθέστε αμέσως 150 μl SMB σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας CAP1 MIDI.
Εάν χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή του SMB, συμπεριλάβετε συντελεστή πλεονάσματος 1,15 κατά την κλασματοποίηση, ώστε να υπάρχει επαρκές υλικό ανά δείγμα.
5. Απορρίψτε τυχόν υπολειπόμενο υλικό μετά την προσθήκη του SMB σε κάθε βοθρίο δείγματος.

6. Ρυθμίστε την πιπέτα στα 50 µl και μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο κάθε βιβλιοθήκης από την πλάκα HYB1 PCR στο αντίστοιχο βοθρίο στην πλάκα CAP1 MIDI.
7. Απορρίψτε την άδεια πλάκα HYB1 PCR.
8. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα CAP1 MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
9. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
10. Επωάστε στον προθερμασμένο επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 57 °C για 25 λεπτά.
11. Τοποθετήστε την πλάκα CAP1 MIDI σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
12. Κρατήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 µl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα ([Πλύση στη σελίδα 70](#)). Μην αφήνετε το ίζημα σφαιριδίων να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να υπάρχει υγρό.

Πλύση

1. Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
 - a. Αφαιρέστε την πλάκα CAP1 MIDI από τη μαγνητική βάση.
 - b. Προσθέστε 200 µl EEW σε κάθε βοθρίο.
 - c. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα ρυθμισμένη στα 150 µl και πιπετάρετε τουλάχιστον 10 φορές για ανάμειξη. Βεβαιωθείτε ότι όλα τα σφαιρίδια έχουν επανεναιωρηθεί.
Βεβαιωθείτε ότι δεν υπάρχουν ιζήματα σφαιριδίων αναρροφώντας προσεκτικά όλο το διάλυμα σφαιριδίων από το βοθρίο μέσα στο ρύγχος. Επιθεωρήστε οπτικά τον πυθμένα κάθε βοθρίου. Εάν υπάρχει ίζημα σφαιριδίων, γείρετε το ρύγχος της πιπέτας προς το ίζημα κατά τη διάρκεια των βημάτων πλύσης, για να αποκολλήσετε το ίζημα. Βεβαιωθείτε ότι το ίζημα σφαιριδίων είναι πλήρως βυθισμένο στο διάλυμα. Το διάλυμα θα πρέπει να έχει σκούρο καφέ χρώμα και ομογενοποιημένη σύσταση.
 - d. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα CAP1 MIDI.
 - e. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
 - f. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 4 λεπτά.
 - g. Επωάστε σε επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 57 °C για 5 λεπτά.
 - h. Τοποθετήστε την πλάκα CAP1 MIDI σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
 - i. Κρατήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 µl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.
2. Εκπλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
3. Πλύνετε τα σφαιρίδια για **τρίτη** φορά.
4. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα με λεπτά άκρα για να αφαιρέσετε το υπολειπόμενο EEW από κάθε βοθρίο.

Έκλουση

1. Αφαιρέστε την πλάκα CAP1 MIDI από τη μαγνητική βάση.
2. Περιδινήστε το φρέσκο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 και κατόπιν φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
3. Προσθέστε προσεκτικά 17 µl μείγματος έκλουσης EE2 + HP3 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα CAP1 MIDI.
4. Απορρίψτε το υπόλοιπο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3.
5. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα CAP1 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
6. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
7. Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
8. Επισημάνετε μια νέα πλάκα PCR 96 βοθρίων ELU1 (Έκλουση 1).
9. Περιδινήστε το ET2 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
10. Προσθέστε 5 µl ET2 σε κάθε αντίστοιχο βοθρίο βιβλιοθήκης στη νέα πλάκα PCR ELU1.

11. Μεταφέρετε προσεκτικά 15 μl εκλούσματος από κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας CAP1 MIDI στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας ELU1 PCR.
12. Απορρίψτε την άδεια πλάκα CAP1 MIDI.
13. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR ELU1.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
14. Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
15. Επιστρέψτε το EEW στον χώρο αποθήκευσης.

Ρύθμιση δεύτερου υβριδισμού

Αυτό το βήμα δεσμεύει τις στοχευόμενες περιοχές των βιβλιοθηκών εμπλουτισμένου cDNA ή/και gDNA με ανιχνευτές σύλληψης για δεύτερη φορά. Ο δεύτερος υβριδισμός εξασφαλίζει υψηλή ειδικότητα των περιοχών που έχουν συλληφθεί. Για να εξασφαλίσετε τον βέλτιστο εμπλουτισμό των βιβλιοθηκών, εκτελέστε το δεύτερο βήμα υβριδισμού στους 57 °C για τουλάχιστον 1,5 ώρα έως 4 ώρες το μέγιστο.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - TCB1 — Θερμάνετε το σωληνάριο στους 37 °C για 5 λεπτά. Περιδινήστε για ανάμειξη επί 10 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - TCA1 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - OPR1 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - OPD2 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

Διαδικασία

1. Επιθεωρήστε το TCB1 για ιζήματα. Εάν υπάρχουν, θερμάνετε ξανά το σωληνάριο και περιδινήστε έως ότου διαλυθούν οι κρύσταλλοι.
2. Προσθέστε 15 μl TCB1 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα PCR ELU1.
3. Προσθέστε 10 μl TCA1 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης.
4. Προσθέστε τον ίδιο ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του πρώτου υβριδισμού σε κάθε υποδοχή. Προσθέστε μόνο ένα σετ ανιχνευτών ανά βοθρίο.

Μη συνδυάζετε διαφορετικούς τύπους ανιχνευτών μεταξύ τους.

- **[Βοθρία βιβλιοθήκης RNA]** — Προσθέστε 5 μl OPR1 (κόκκινο πώμα) σε κάθε βιβλιοθήκη που προέρχεται από RNA.
 - **[Βοθρία βιβλιοθήκης DNA]** — Προσθέστε 5 μl OPD2 (λευκό πώμα) σε κάθε βιβλιοθήκη που προέρχεται από DNA.
5. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR ELU1.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.

- Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
- Τοποθετήστε σε θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα HYB2.
Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).
- Υβριδοποιήστε στους 57 °C για χρονικό διάστημα από τουλάχιστον 1,5 ώρα έως και 4 ώρες το μέγιστο.
- Επιστρέψτε τα αντιδραστήρια υβριδισμού στον χώρο αποθήκευσης.

Σύλληψη στόχων δύο

Αυτό το βήμα χρησιμοποιεί SMB για τη σύλληψη ανιχνευτών υβριδισμένων στις στοχευόμενες περιοχές ενδιαφέροντος. Τα σφαιρίδια πλένονται μία φορά με RSB. Οι εμπλουτισμένες βιβλιοθήκες εκκλούνται με τη χρήση φρέσκου μείγματος έκλουσης EE2 + HP3 και εξουδετερώνονται με ET2.

Προετοιμασία

- Προθερμάνετε έναν επωαστήρα μικροδειγμάτων με ένθετο θερμαντικής συσκευής MIDI στους 57 °C.
- Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - EE2 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - HP3 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - SMB — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε το **SMB**, όχι το SPB για αυτήν τη διαδικασία.
 - RSB — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
 - ET2 — Αφήστε στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- Παρασκευάστε φρέσκο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.

Πίνακα 30 Μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 για σύλληψη στόχων δύο*

Συστατικό μείγματος έκλουσης	4 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
EE2	114 μl	228 μl	456 μl	684 μl	1.368 μl
HP3	6 μl	12 μl	24 μl	36 μl	72 μl

* Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Ανατρέξτε στην ενότητα [Χειρισμός αντιδραστηρίων στη σελίδα 37](#) για τους υπολογισμούς.

- Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη για το βήμα [Έκλυση στη σελίδα 74](#).
- Επισημάνετε μια νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων CAP2 (Σύλληψη 2).
- Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

Διαδικασία

Δέσμευση

1. Αφαιρέστε την πλάκα PCR ELU1 από τον θερμικό κυκλοποιητή.
2. Φυγοκεντρήστε την πλάκα PCR ELU1 στα 280 × g για 1 λεπτό.
3. Περιδινήστε το SMB για 1 λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
Εάν υπάρχει ίζημα ή ίζημα σφαιριδίων, βεβαιωθείτε ότι φθάνετε σε θερμοκρασία δωματίου, αναρροφήστε με πιπέτα πάνω-κάτω για να απελευθερώσετε το ίζημα και κατόπιν αναμείξτε σε αναδευτήρα τύπου vortex για να το επαναιωρήσετε.
4. Προσθέστε αμέσως 150 μl SMB σε κάθε βοθρίο της βιβλιοθήκης της πλάκας CAP2 MIDI.
Εάν χρησιμοποιείτε δοχείο για τη διανομή του SMB, συμπεριλάβετε συντελεστή πλεονάσματος 1,15 κατά την κλασματοποίηση, ώστε να υπάρχει επαρκές υλικό ανά δείγμα.
5. Απορρίψτε τυχόν υπολειπόμενο υλικό μετά την προσθήκη του SMB σε κάθε βοθρίο δείγματος.
6. Ρυθμίστε την πιπέτα στα 50 μl και μεταφέρετε ολόκληρο τον όγκο κάθε βιβλιοθήκης από την πλάκα ELU1 PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας CAP2 MIDI.
7. Απορρίψτε την άδεια πλάκα PCR ELU1.
8. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα CAP2 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
9. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
10. Επωάστε σε επωαστήρα μικροδειγμάτων στους 57 °C για 25 λεπτά.
Εάν συνεχίσετε με την [Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης στη σελίδα 76](#), ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης για τα αντιδραστήρια στην ενότητα [Προετοιμασία για το πρωτόκολλο](#).
11. Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
12. Κρατήστε την πλάκα CAP2 MIDI πάνω στη μαγνητική βάση. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Μεταβείτε αμέσως στο επόμενο βήμα ([Πλύση στη σελίδα 73](#)). Μην αφήνετε το ίζημα σφαιριδίων να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να υπάρχει υγρό.

Πλύση

1. Αφαιρέστε την πλάκα CAP2 MIDI από τη μαγνητική βάση.
2. Αναστρέψτε ή περιδινήστε το RSB για ανάμειξη.
3. Προσθέστε 200 μl RSB σε κάθε βοθρίο.
4. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα CAP2 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.

5. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 4 λεπτά.
6. Τοποθετήστε την πλάκα στη μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
7. Κρατήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.
8. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα με λεπτά άκρα για να αφαιρέσετε το υπολειπόμενο RSB από κάθε βοθρίο.

Έκλουση

1. Αφαιρέστε την πλάκα CAP2 MIDI από τη μαγνητική βάση.
2. Περιδινήστε το φρέσκο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 και κατόπιν φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
3. Προσθέστε 22 μl μείγματος έκλουσης EE2 + HP3 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στην πλάκα CAP2 MIDI.
4. Απορρίψτε το υπόλοιπο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3.
5. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα CAP2 MIDI.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
6. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
7. Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
8. Επισημάνετε μια νέα πλάκα PCR 96 βοθρίων ELU2 (Έκλουση 2).
9. Περιδινήστε το ET2 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
10. Προσθέστε 5 μl ET2 σε κάθε αντίστοιχο βοθρίο της βιβλιοθήκης στη νέα πλάκα ELU2 PCR.
11. Μεταφέρετε προσεκτικά 20 μl εκλούσματος από κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας CAP2 MIDI στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας ELU2 PCR.
12. Απορρίψτε την άδεια πλάκα CAP2 MIDI.
13. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα ELU2 PCR.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
14. Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
15. Επιστρέψτε τα SMB, EE2, HP3, RSB και ET2 στον χώρο αποθήκευσης.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, φυγοκεντρήστε την πλάκα ELU2 PCR στα 280 × g για 1 λεπτό και φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως και 7 ημέρες.

Προετοιμασία για το πρώτο κόλλο

Αυτή η προετοιμασία απαιτείται για την εκτέλεση των βημάτων του πρωτοκόλλου που οδηγούν στο επόμενο ασφαλές σημείο διακοπής.

1. Ετοιμάστε ένα δοχείο πάγου ή ισοδύναμο.
2. Αφαιρέστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίων από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακα 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) Box (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ τοκόλλου
PPC3	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης
EPM	-25 °C έως -15 °C	Διατηρήστε το κρύο.	Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

Πίνακα 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) Box (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα προ τοκόλλου
SPB (ετικέτα ανοιχτού πράσινου χρώματος)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός ενισχυμένης εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης
RSB	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Καθαρισμός ενισχυμένης εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης Προετοιμασία για αλληλούχιση

Ενίσχυση εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

Αυτό το βήμα χρησιμοποιεί εκκινητές για την ενίσχυση εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών.

Προετοιμασία

1. Εάν η πλάκα ELU2 αποθηκεύτηκε, αποψύξτε την σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.

Διαδικασία

1. Περιδινήστε το PPC3 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
2. Προσθέστε 5 μl PPC3 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας ELU2 PCR.
3. Περιδινήστε το EPM για ανάμειξη επί 5 δευτερόλεπτα και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
4. Προσθέστε 20 μl EPM σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης.
5. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα ELU2 PCR. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
6. Ανακινήστε στις 1.200 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
7. Τοποθετήστε στον θερμικό κυκλοποιητή και εκτελέστε το πρόγραμμα EL-PCR.
Ανατρέξτε στην ενότητα [Προγραμματισμός θερμικών κυκλοποιητών στη σελίδα 47](#).
Εάν συνεχίσετε με την [Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών στη σελίδα 79](#), ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης στην ενότητα [Προετοιμασία για το πρωτόκολλο](#).
8. Επιστρέψτε το PPC3 και το EPM στον χώρο αποθήκευσης.

Καθαρισμός ενισχυμένης εμπλουτισμένης βιβλιοθήκης

Αυτό το βήμα χρησιμοποιεί SPB για τον καθαρισμό των εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών από ανεπιθύμητα στοιχεία αντίδρασης. Τα σφαιρίδια πλένονται δύο φορές με φρέσκια αιθανόλη 80%. Οι βιβλιοθήκες εκλούνται με RSB.

Προετοιμασία

1. Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - SPB — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Βεβαιωθείτε ότι χρησιμοποιείτε **SPB**, όχι SMB για αυτήν τη διαδικασία.
 - RSB — Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
2. Παρασκευάστε φρέσκια αιθανόλη 80% σε κωνικό σωληνάριο των 15 ml ή των 50 ml.

Πίνακα 33 Παρασκευάστε φρέσκια αιθανόλη 80%

Αντιδραστήριο	4 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
100% EtOH, καθαρή	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 μl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Περιδινήστε φρέσκο EtOH 80% για ανάμειξη.
4. Επισημάνετε νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων BIND2 (Δέσμευση καθαρισμού).
5. Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

Διαδικασία

Δέσμευση

1. Αφαιρέστε την πλάκα ELU2 PCR από τον θερμικό κυκλοποιητή.
2. Φυγοκεντρήστε την πλάκα ELU2 PCR στα 280 × g για 1 λεπτό.
3. Περιδινήστε το SPB επί 1 λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
4. Προσθέστε αμέσως 110 μl SPB σε κάθε βοθρίο της βιβλιοθήκης της πλάκας BIND2 MIDI.
5. Μεταφέρετε 50 μl κάθε βιβλιοθήκης από την πλάκα ELU2 PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας BIND2 MIDI.
6. Απορρίψτε την άδεια πλάκα ELU2 PCR.
7. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BIND2 MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
8. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
9. Επιάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
10. Τοποθετήστε την πλάκα BIND2 MIDI σε μαγνητική βάση για 5 λεπτά.
11. Κρατήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.

Έκπλυση

1. Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
 - a. Διατηρήστε την πλάκα BIND2 MIDI στη μαγνητική βάση και προσθέστε 200 μl φρέσκο EtOH 80% σε κάθε βοθρίο.
 - b. Περιμένετε 30 δευτερόλεπτα.
 - c. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοθρίο.

2. Εκπλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
3. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα με λεπτά άκρα για να αφαιρέσετε το υπολειπόμενο EtOH από κάθε βοθρίο.
4. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο EtOH 80%.

Έκλουση

1. Αφαιρέστε την πλάκα BIND2 MIDI από τη μαγνητική βάση.
2. Αναστρέψτε ή περιδινήστε για να αναμιχθεί το RSB.
3. Προσθέστε 32 μl RSB σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης.
4. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BIND2 MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
5. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
6. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
7. Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
8. Επισημάνετε μια νέα πλάκα PCR 96 βοθρίων PL (Κεκαθαρμένες βιβλιοθήκες).
9. Μεταφέρετε 30 μl από κάθε έκλουσμα από την πλάκα BIND2 MIDI στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας PL PCR.
10. Απορρίψτε την άδεια πλάκα BIND2 MIDI.
11. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποιητικό πλακών στην πλάκα PL PCR.
12. Επιστρέψτε το SPB και το RSB στον χώρο αποθήκευσης.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, φυγοκεντρήστε την πλάκα PL PCR στα 280 × g για 1 λεπτό και φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως και 30 ημέρες.

Προετοιμασία για το πρ^οτόκολλο

Αυτή η προετοιμασία απαιτείται για την εκτέλεση των βημάτων του πρωτοκόλλου που οδηγούν στο επόμενο ασφαλές σημείο διακοπής.

1. Αφαιρέστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίων από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακα 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) Box (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρ ^ο τόκολλου
LNA1	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
EE2	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών

Πίνακα 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) Box (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτοκόλλου
LNB1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε για 30 λεπτά ώστε να έλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
HP3	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών Προετοιμασία για αλληλούχηση
LNW1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών
LNS1	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών

2. Εάν συνεχίζετε την ίδια ημέρα με την επιλογή [Προετοιμασία για αλληλούχηση στη σελίδα 83](#), ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης στην ενότητα [Προετοιμασία για το πρωτόκολλο](#).

Κανονικοποίηση βιβλιοθηκών

Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιεί LNB1 συν πρόσθετα (LNA1) για την κανονικοποίηση της ποσότητας κάθε βιβλιοθήκης, ώστε να διασφαλιστεί ομοιόμορφη αναπαράσταση της βιβλιοθήκης στις ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες. Τα σφαιρίδια πλένονται δύο φορές με LNW1. Οι βιβλιοθήκες εκλούνται με φρέσκο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 και εξουδετερώνονται με LNS1.

Προετοιμασία

- Προετοιμάστε τα παρακάτω αντιδραστήρια.
 - LNB1 — Βεβαιωθείτε ότι τα σφαιρίδια βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
 - LNA1 — Περιδινήστε για ανάμειξη.
 - EE2 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - HP3 — Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
 - LNW1 — Περιδινήστε για ανάμειξη. Αφήστε στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
 - LNS1 — Περιδινήστε για ανάμειξη. Βάλτε το στην άκρη για χρήση στη διαδικασία.
- Περιδινήστε το LNB1 για 1 λεπτό για να επανεναιωρηθούν τα σφαιρίδια.
Αναστρέψτε το σωληνάριο LNB1 για να βεβαιωθείτε ότι όλα τα σφαιρίδια έχουν επανεναιωρηθεί.
- Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα ρυθμισμένη στα 800 μl, για να πιπετάρετε το LNB1 πάνω-κάτω 10 φορές, για να διασφαλίσετε την επαναιώρηση.
- Παρασκευάστε αμέσως φρέσκο βασικό μείγμα LNA1 + LNB1 σε κωνικό σωληνάριο.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Επανεναιωρήστε πλήρως το ίζημα σφαιριδίων LNB1 στον πυθμένα του σωληναρίου για να αποτρέψετε την ανομοιόμορφη πυκνότητα των συστάδων.

Πίνακα 36 Βασικό μείγμα LNA1 + LNB1*

Συστατικό βασικού μείγματος	4 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
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

* Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Ανατρέξτε στην ενότητα [Χειρισμός αντιδραστηρίων στη σελίδα 37](#) για τους υπολογισμούς.

- Περιδινήστε το βασικό μείγμα LNA1 + LNB1. Αφήστε στην άκρη για το βήμα [Δέσμευση στη σελίδα 80](#).
- Παρασκευάστε φρέσκο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 σε σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης.

Πίνακα 37 Μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 για κανονικοποίηση βιβλιοθηκών*

Συστατικό μείγματος έκλουσης	4 Βιβλιοθήκες	8 Βιβλιοθήκες	16 Βιβλιοθήκες	24 Βιβλιοθήκες	48 Βιβλιοθήκες
EE2	152 μl	304 μl	608 μl	912 μl	1.824 μl
HP3	8 μl	16 μl	32 μl	48 μl	96 μl

* Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει το πλεόνασμα όγκου. Ανατρέξτε στην ενότητα [Χειρισμός αντιδραστηρίων στη σελίδα 37](#) για τους υπολογισμούς.

- Περιδινήστε φρέσκο μείγμα έκλουσης και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα. Αφήστε στην άκρη για το βήμα [Έκλουση στη σελίδα 81](#).
- Εάν η πλάκα PL PCR αποθηκεύτηκε, αποφύγετε σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό. Πιπετάρετε για ανάμειξη.
- Επισημάνετε μια νέα πλάκα MIDI 96 βοθρίων BBN (Κανονικοποίηση βάσει σφαιριδίων).
- Τοποθετήστε τον μαγνήτη.

Διαδικασία**Δέσμευση**

- Περιδινήστε το βασικό μείγμα LNA1 + LNB1.
- Προσθέστε αμέσως 45 μl βασικού μείγματος LNA1 + LNB1 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης της πλάκας BBN MIDI.
- Απορρίψτε το υπόλοιπο βασικό μείγμα LNA1 + LNB1.
- Προσθέστε 20 μl κάθε βιβλιοθήκης από την πλάκα PL PCR στο αντίστοιχο βοθρίο της πλάκας BBN MIDI.

5. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BBN MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
6. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 30 λεπτά.
7. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR PL και επιστρέψτε την στον χώρο αποθήκευσης.
8. Τοποθετήστε την πλάκα BBN MIDI σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
9. Κρατήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοηθίο.

Έκπλυση

1. Πλύνετε τα σφαιρίδια ως εξής.
 - a. Αφαιρέστε την πλάκα BBN MIDI από τη μαγνητική βάση.
 - b. Προσθέστε 45 μl LNW1 σε κάθε βοηθίο βιβλιοθήκης.
 - c. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BBN MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
 - d. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 5 λεπτά.
 - e. Τοποθετήστε την πλάκα BBN MIDI σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
 - f. Κρατήστε την πλάκα πάνω στη μαγνητική βάση. Χωρίς να διαταράξετε το ίζημα σφαιριδίων, χρησιμοποιήστε πιπέτα ρυθμισμένη στα 200 μl για να αφαιρέσετε και να απορρίψετε όλο το υπερκείμενο υγρό από κάθε βοηθίο.
2. Εκπλύνετε τα σφαιρίδια για **δεύτερη** φορά.
3. Χρησιμοποιήστε μια πιπέτα με λεπτά άκρα για να αφαιρέσετε το υπολειπόμενο υπερκείμενο υγρό από κάθε βοηθίο.

Έκλουση

1. Αφαιρέστε την πλάκα BBN MIDI από τη μαγνητική βάση.
2. Περιδινήστε το φρέσκο μείγμα έκλουσης EE2 + HP3 και κατόπιν φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
3. Προσθέστε 32 μl διαλύματος EE2 + HP3 σε κάθε βοηθίο βιβλιοθήκης της πλάκας BBN MIDI.
4. Απορρίψτε το υπόλοιπο μείγμα έκλουσης.
5. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο στεγανοποίησης πλακών στην πλάκα BBN MIDI. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
6. Ανακινήστε στις 1.800 σ.α.λ. για 2 λεπτά.
7. Τοποθετήστε σε μαγνητική βάση για 2 λεπτά.
8. Επισημάνετε μια νέα πλάκα PCR 96 βοηθίων NL (Κανονικοποιημένες βιβλιοθήκες).
9. Μεταφέρετε προσεκτικά 30 μl εκλούσματος από κάθε βοηθίο βιβλιοθήκης της πλάκας BBN MIDI στο αντίστοιχο βοηθίο της πλάκας NL PCR.

**ΠΡΟΣΟΧΗ**

Εάν αναρροφηθούν σφαιρίδια στα ρύγχη των πιπετών, επαναδιανείμετε τα σφαιρίδια στην πλάκα στη μαγνητική βάση και περιμένετε μέχρι να γίνει διαυγές το υγρό (~2 λεπτά) πριν μεταβείτε στο επόμενο βήμα της διαδικασίας.

10. Απορρίψτε την άδεια πλάκα BBN MIDI.
11. Περιδινήστε το LNS1 για ανάμειξη.
12. Προσθέστε 30 µl LNS1 σε κάθε βοθρίο βιβλιοθήκης στη νέα πλάκα PCR NL.
13. Πιπετάρετε για ανάμειξη πέντε φορές.
14. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR NL.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοθρία.
15. Επιστρέψτε το LNB1, LNA1, EE2, LNW1 και LNS1 στον χώρο αποθήκευσης.

ΣΗΜΕΙΟ ΑΣΦΑΛΟΥΣ ΔΙΑΚΟΠΗΣ

Εάν πρόκειται να διακόψετε τη διαδικασία, φυγοκεντρήστε την πλάκα PCR NL στα 280 × g για 1 λεπτό και φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως και 32 ημέρες.

Προετοιμασία για το πρωτόκολλο

Αυτή η προετοιμασία απαιτείται για την εκτέλεση των βημάτων του πρωτοκόλλου που οδηγούν στην αλληλούχιση.

Ξεκινήστε την προετοιμασία των αναλωσίμων αλληλούχισης από το κιτ αντιδραστηρίων NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 κύκλων) (Κωδικός είδους 20028871) τουλάχιστον μία ώρα πριν από τη χρήση.

1. Αφαιρέστε το ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης βιβλιοθηκών (HT1) από το χώρο αποθήκευσης -25°C έως -15°C. Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απόψυξη, διατηρήστε το κρύο.
2. Ακολουθήστε τις οδηγίες προετοιμασίας στο *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513) για άλλα αναλώσιμα που περιλαμβάνονται στο κιτ.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 κύκλων)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 κύκλων)
3. Αφαιρέστε τα σωληνάρια αντιδραστηρίων από το κουτί και ακολουθήστε τις οδηγίες απόψυξης.

Πίνακα 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (Κατάψυξη) Box (Κωδικός είδους 20031121)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτόκολλου
PhiX Internal Control (PX3 ή PhiX)	-25 °C έως -15 °C	Αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την απόψυξη, διατηρήστε το κρύο.	Προετοιμασία για αλληλούχιση

Πίνακα 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Ψύξη) Box (Κωδικός είδους 20031123)

Αντιδραστήριο	Αποθήκευση	Οδηγίες απόψυξης	Βήμα πρωτόκολλου
HP3	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Προετοιμασία για αλληλούχιση
RSB (ροζ ετικέτα)	2 °C έως 8 °C	Αφήστε τα να έλθει σε θερμοκρασία δωματίου.	Προετοιμασία για αλληλούχιση

Προετοιμασία για αλληλούχιση

Κάθε εκτέλεση αλληλούχισης DNA και RNA θα πρέπει να περιλαμβάνει έναν θετικό μάρτυρα και έναν NTC. Κάθε NTC για DNA και RNA υποβάλλεται σε αλληλούχιση επανειλημμένα, όπως απαιτείται, έτσι ώστε κάθε εκτέλεση να περιέχει έναν NTC. Κάθε εκτέλεση DNA και RNA περιλαμβάνει έναν ξεχωριστό θετικό μάρτυρα.

Προετοιμασία

1. Εξετάστε τις κατευθυντήριες οδηγίες για τον [Αριθμός βιβλιοθηκών και επιλογή ευρετηρίων στη σελίδα 39](#).
2. Επιστημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης dHP3 (αραιωμένο HP3).
3. Επιστημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρησης dPhiX (αραιωμένο PhiX).

4. Προθερμάνετε θερμαντική συσκευή στους 96 °C για σωληνάρια μικροφυγοκέντρωσης.
5. Ετοιμάστε ένα δοχείο πάγου ή ισοδύναμο.

Αραίωση και αποδιάταξη μάρτυρα PhiX

1. Περιδινήστε το HP3 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
2. Συνδυάστε τους παρακάτω όγκους στο σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης dHP3.
 - 10 μl HP3
 - 190 μl RNase/DNase-free water
3. Περιδινήστε το dHP3 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
4. Αναστρέψτε ή περιδινήστε το RSB για ανάμειξη.
5. Περιδινήστε τον μάρτυρα PhiX για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
6. Συνδυάστε τους παρακάτω όγκους στο σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης dPhiX.
 - 8 μl RSB
 - 2 μl μάρτυρα PhiX
7. Προσθέστε 10 μl dHP3 στο σωληνάριο dPhiX.
8. Απορρίψτε το σωληνάριο dHP3.
9. Περιδινήστε το dPhiX για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
10. Επωάστε το dPhiX σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά για αποδιάταξη.
11. Περιδινήστε το HT1 για ανάμειξη.
12. Προσθέστε αμέσως 980 μl προψυγμένο HT1 στο dPhiX.
13. Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
14. Διατηρήστε το PhiX ψυχρό μέχρι να χρησιμοποιηθεί στην προετοιμασία για τη δεύτερη αραιώση.
Η τελική συγκέντρωση είναι 20 pM dPhiX.
15. Επιστρέψτε τα PhiX, HP3 και RSB στον αποθηκευτικό χώρο.

Ομαδοποίηση και αποδιάταξη βιβλιοθηκών για το TSO Comprehensive (EU)

1. Εάν η πλάκα PCR NL αποθηκεύτηκε, αποψύξτε σε θερμοκρασία δωματίου και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε στα 280 × g για 1 λεπτό.
2. Χρησιμοποιώντας πιπέτα πολλαπλών καναλιών ρυθμισμένη στα 30 μl, αναμείξτε ήπια με την πιπέτα τις βιβλιοθήκες στην πλάκα PCR NL πέντε φορές.
Χρησιμοποιήστε καινούργια ρύγχη για κάθε βιβλιοθήκη.



ΠΡΟΣΟΧΗ

Φροντίστε να αναμιγνύετε καλά τις βιβλιοθήκες για βέλτιστη απόδοση.

3. Επιλέξτε μία από τις παρακάτω επιλογές για να ομαδοποιήσετε, να αποδιατάξετε και να αραιώσετε τις βιβλιοθήκες.

- **[Επιλογή 1]** Αλληλούχιση βιβλιοθηκών που προέρχονται από δείγματα RNA και δείγματα DNA ταυτόχρονα. Ανατρέξτε στην [Επιλογή 1: Βιβλιοθήκες DNA και RNA μαζί στη σελίδα 85](#).
- **[Επιλογή 2]** Αλληλούχιση βιβλιοθηκών που προέρχονται μόνο από δείγματα DNA. Ανατρέξτε στην [Επιλογή 2: Βιβλιοθήκες DNA μόνο στη σελίδα 86](#).
- **[Επιλογή 3]** Αλληλούχιση βιβλιοθηκών που προέρχονται μόνο από δείγματα RNA. Ανατρέξτε στην [Επιλογή 3: Βιβλιοθήκες RNA μόνο στη σελίδα 87](#).

Επιλογή 1: Βιβλιοθήκες DNA και RNA μαζί

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης PRL (Ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες RNA).
2. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης PDL (Ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες DNA).
3. Μεταφέρετε 10 μl κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης RNA (cDNA) από την πλάκα NL στο σωληνάριο PRL.
Μην ομαδοποιείτε δύο βιβλιοθήκες με τον ίδιο εκκινητή ευρετηρίου.
4. Μεταφέρετε 10 μl κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης DNA από την πλάκα NL στο σωληνάριο PDL.
Μην ομαδοποιείτε δύο βιβλιοθήκες με τον ίδιο εκκινητή ευρετηρίου.
5. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR NL.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
6. Περιδινήστε τα σωληνάρια PRL και PDL για ανάμειξη.
7. Φυγοκεντρήστε για λίγο τα σωληνάρια PRL και PDL.
8. Επωάστε τα σωληνάρια PRL και PDL σε θερμαντική συσκευή στους 96 °C για 2 λεπτά.
9. Διατηρήστε τα σωληνάρια PRL και PDL κρύα για 5 λεπτά.
10. Περιδινήστε τα σωληνάρια PRL και PDL για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
11. Διατηρείτε τα σωληνάρια PRL και PDL κρύα.

Παρασκευή πρώτης αραίωσης

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης DIL1 (Αραίωση 1).
2. Μεταφέρετε 20 μl PDL στο κενό σωληνάριο DIL1.
3. Προσθέστε 5 μl PRL στο σωληνάριο DIL1.
4. Απορρίψτε τα σωληνάρια PDL και PRL.
5. Προσθέστε 475 μl προφυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL1 (αραίωση 1:20).
6. Περιδινήστε το σωληνάριο DIL1 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

Παρασκευή δεύτερης αραίωσης

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 2,0 ml DIL2 (Αραίωση 2).

2. Μεταφέρετε 40 µl DIL1 στο κενό σωληνάριο DIL2.
3. Απορρίψτε το σωληνάριο DIL1.
4. Προσθέστε 1.660 µl προφυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL2 (αραίωση 1:850).
5. Περιδινήστε το παρασκευασμένο 20 pM dPhiX για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
6. Προσθέστε 2,5 µl παρασκευασμένου 20 pM dPhiX στο σωληνάριο DIL2.
7. Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
8. Φορτώστε 1.300 µl DIL2 στην αποφυγμένη φύσιγγα αντιδραστηρίων NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων).
Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513).
9. Απορρίψτε το σωληνάριο DIL2.
10. Φυγοκεντρήστε την πλάκα NL PCR στα 280 × g για 1 λεπτό και κατόπιν φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 32 ημέρες.
11. Μεταβείτε στην αλληλούχιση.
Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513).

Επιλογή 2: Βιβλιοθήκες DNA μόνο

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης PDL (Ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες DNA).
2. Μεταφέρετε 10 µl κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης DNA από την πλάκα NL στο σωληνάριο PDL. Μην ομαδοποιείτε δύο βιβλιοθήκες με τον ίδιο εκκινητή ευρετηρίου.
3. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR NL. Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία.
4. Περιδινήστε το σωληνάριο PDL για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
5. Επιάστε το σωληνάριο PDL σε θερμαντική συσκευή στους 96 °C για 2 λεπτά.
6. Διατηρήστε το σωληνάριο PDL κρύο για 5 λεπτά.
7. Περιδινήστε το σωληνάριο PDL για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
8. Διατηρείτε το σωληνάριο PDL κρύο.

Παρασκευή πρ ή της αραι ή σης

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης DIL1 (Αραίωση 1).
2. Μεταφέρετε 10 µl PDL στο κενό σωληνάριο DIL1.
3. Απορρίψτε το σωληνάριο PDL.
4. Προσθέστε 190 µl προφυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL1 (αραίωση 1:20).
5. Περιδινήστε το DIL1 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

Παρασκευή δεύτερης αραίωσης

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 2,0 ml DIL2 (Αραίωση 2).
2. Μεταφέρετε 40 µl DIL1 στο κενό σωληνάριο DIL2.
3. Απορρίψτε το σωληνάριο DIL1.
4. Προσθέστε 1.660 µl προφυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL2 (αραίωση 1:850).
5. Περιδινήστε το παρασκευασμένο 20 pM dPhiX και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
6. Προσθέστε 2,5 µl παρασκευασμένου 20 pM dPhiX στο σωληνάριο DIL2.
7. Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
8. Φορτώστε 1.300 µl DIL2 στην αποφυγμένη φύσιγγα αντιδραστηρίων NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων).
Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513).
9. Απορρίψτε το σωληνάριο DIL2.
10. Φυγοκεντρήστε την πλάκα NL PCR στα 280 × g για 1 λεπτό και κατόπιν φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 32 ημέρες.
11. Μεταβείτε στην αλληλούχιση.
Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513).

Επιλογή 3: Βιβλιοθήκες RNA μόνο

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης PRL (Ομαδοποιημένες βιβλιοθήκες RNA).
2. Μεταφέρετε 10 µl κάθε κανονικοποιημένης βιβλιοθήκης RNA (cDNA) από την πλάκα NL στο σωληνάριο PRL.
Μην ομαδοποιείτε δύο βιβλιοθήκες με τον ίδιο εκκινητή ευρετηρίου.
3. Εφαρμόστε αυτοκόλλητο σταγανοποίησης πλακών στην πλάκα PCR NL.
Σφραγίστε πλήρως τα άκρα και τα βοηθία για να αποτρέψετε την εξάτμιση.
4. Περιδινήστε το σωληνάριο PRL για ανάμειξη.
5. Φυγοκεντρήστε για λίγο το σωληνάριο PRL.
6. Επωάστε το σωληνάριο PRL σε θερμαντική συσκευή στους 96 °C για 2 λεπτά.
7. Διατηρήστε το σωληνάριο PRL κρύο για 5 λεπτά.
8. Περιδινήστε το σωληνάριο PRL για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
9. Διατηρείτε το σωληνάριο PDL κρύο.

Παρασκευή πρώτης αραίωσης

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης DIL1 (Αραίωση 1).
2. Μεταφέρετε 10 µl PRL στο κενό σωληνάριο DIL1.

3. Απορρίψτε το σωληνάριο PRL.
4. Προσθέστε 190 µl προψυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL1 (αραίωση 1:20).
5. Περιδινήστε το DIL1 για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.

Παρασκευή δεύτερης αραιώσεως

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρωσης 2,0 ml DIL2 (Αραίωση 2).
2. Μεταφέρετε 40 µl DIL1 στο κενό σωληνάριο DIL2.
3. Απορρίψτε το σωληνάριο DIL1.
4. Προσθέστε 1.646 µl προψυγμένο HT1 στο σωληνάριο DIL2 (αραίωση 1:843).
5. Περιδινήστε το παρασκευασμένο 20 pM dPhiX και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
6. Προσθέστε 16,7 µl παρασκευασμένου 20 pM dPhiX στο σωληνάριο DIL2.
7. Περιδινήστε για ανάμειξη και, στη συνέχεια, φυγοκεντρήστε για σύντομο διάστημα.
8. Φορτώστε 1.300 µl DIL2 στην αποψυγμένη φύσιγγα αντιδραστηρίων NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 κύκλων).
Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513).
9. Απορρίψτε το σωληνάριο DIL2.
10. Φυγοκεντρήστε την πλάκα NL PCR στα 280 × g για 1 λεπτό και φυλάξτε την σε θερμοκρασία -25 °C έως -15 °C για έως 32 ημέρες.
11. Μεταβείτε στην αλληλούχιση.
Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα *Οδηγός αναφοράς οργάνου NextSeq 550Dx* (αρ. εγγράφου 1000000009513).

Ερμηνεία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα αλληλούχισης από τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) αναφέρονται για κάθε δείγμα μεμονωμένα σε μια αναφορά σε μορφή PDF και μια αναφορά σε μορφή JSON. Στο επίπεδο δείγματος δημιουργείται επίσης μια αναφορά χαμηλού βάθους (*LowDepthReport.tsv*).

Στο επίπεδο εκτέλεσης, δημιουργούνται τα ακόλουθα αρχεία εξόδου:

- *ControlOutput.tsv*
- *MetricsOutput.tsv*

Στις αναφορές PDF και JSON εμφανίζονται μόνο παραλλαγές που ολοκληρώνουν με επιτυχία τον ποιοτικό έλεγχο.

Για λεπτομερείς πληροφορίες ανάλυσης, ανατρέξτε στο *Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200008661).

Αποτελέσματα συνοδευτικής διάγνωσης εξετάσεως

Για κάθε προβλεπόμενη χρήση συνοδευτικής διαγνωστικής εξέτασης (CDx), υπάρχουν τρία πιθανά αποτελέσματα:

- **Θετικό**—Ανιχνεύεται παραλλαγή ή βιοδείκτης και ταξινομείται ως επίπεδο 1 (CDx).
- **Δεν ανιχνεύθηκε**—Δεν ανιχνεύονται στο δείγμα παραλλαγές ή βιοδείκτες που σχετίζονται με την προβλεπόμενη χρήση της CDx. Ο τύπος όγκου που έχει επιλεγεί για το δείγμα είναι κατάλληλος για την CDx.
- **Κανένα αποτέλεσμα**—Ο προσδιορισμός μιας κατάστασης παραλλαγής δεν είναι δυνατός για έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους λόγους:
 - Η προβλεπόμενη χρήση της CDx δεν έχει εφαρμογή για το δείγμα που εξετάστηκε, επειδή ο τύπος όγκου που επιλέχθηκε για το δείγμα δεν είναι κατάλληλος για τον τύπο όγκου της CDx.
 - Η εκτέλεση της αλληλούχισης δεν πληρούσε τις προδιαγραφές ποιοτικού ελέγχου.
 - Η βιβλιοθήκη δεν πληρούσε τις απαιτούμενες προδιαγραφές ποιοτικού ελέγχου.
 - Δεν εκτελέστηκε το κατάλληλο νουκλεϊκό οξύ.

Όλα τα αποτελέσματα προβλεπόμενης χρήσης της CDx αναφέρονται στην ενότητα Αποτελέσματα συνοδευτικών διαγνωστικών εξετάσεων της αναφοράς σε μορφή JSON. Μόνο οι προβλεπόμενες χρήσεις με θετικό αποτέλεσμα παρατίθενται στην ενότητα Αποτελέσματα συνοδευτικών διαγνωστικών εξετάσεων της αναφοράς σε μορφή PDF.

Παραλλαγές προσδιορισμού του προφίλ του όγκου

Το TSO Comprehensive (EU) έχει σχεδιαστεί για την αναφορά σωματικών παραλλαγών κατά την αναφορά παραλλαγών με κλινικά σημαντικές ενδείξεις ή δυνητικά κλινικά σημαντικών παραλλαγών. Το λογισμικό του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) χρησιμοποιεί μια KB που καθορίζει εάν κάθε ανιχνευμένη παραλλαγή που πληρούσε τα κριτήρια ([Πίνακα 2](#)) είναι κλινικά σημαντική ή δυνητικά κλινικά σημαντική με βάση στοιχεία θεραπευτικών, διαγνωστικών ή προγνωστικών συσχετισμών. Η KB λαμβάνει επίσης υπόψη εάν έχουν τεκμηριωθεί (ή όχι) συσχετισμοί στον τύπο του όγκου που εξετάστηκε. Συσχετίσεις επιρρέπειας ή κινδύνου εμφάνισης καρκίνου δεν περιλαμβάνονται στην KB. Οι κοινοί πολυμορφισμοί δεν περιλαμβάνονται.

Για παραλλαγές προσδιορισμού του προφίλ του όγκου, τα θετικά αποτελέσματα ταξινομούνται σε Γονιδιωματικά ευρήματα με κλινικά σημαντικά στοιχεία (Επίπεδο 2) ή σε Γονιδιωματικά ευρήματα με δυνητική κλινική σημασία (Επίπεδο 3) σύμφωνα με την εγκατεστημένη KB και τον ταυτοποιημένο τύπο όγκου.

Οι αποτυχίες ποιοτικού ελέγχου δεν οδηγούν σε αποτελέσματα για τους τύπους παραλλαγών που σχετίζονται με τη μέτρηση του αποτυχημένου ποιοτικού ελέγχου. Ανατρέξτε στον [Πίνακα 40](#) και στον [Πίνακα 41](#) για περισσότερες πληροφορίες. Οι θέσεις προσδιορισμού του προφίλ του όγκου με ανεπαρκές βάθος παρατίθενται στην αναφορά χαμηλού βάθους και όχι στην αναφορά του TSO Comprehensive (EU).

Ποιοτικός έλεγχος

- Για πληροφορίες ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων και ελάχιστες απαιτήσεις υλικού εισόδου, ανατρέξτε στην ενότητα [Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30](#).
- Η εκτέλεση αλληλούχισης και η εγκυρότητα των δειγμάτων καθορίζονται αυτόματα και αναφέρονται από τη Μονάδα ανάλυσης TSO Comprehensive (EU). Για λεπτομερείς πληροφορίες ανάλυσης, ανατρέξτε στο *Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200008661).
- Η αναφορά του TSO Comprehensive (EU), η οποία είναι διαθέσιμη σε μορφή PDF και JSON, συνοψίζει τα αποτελέσματα του ποιοτικού ελέγχου. Τα αρχεία αναφορών βρίσκονται στον φάκελο ανάλυσης. Ανατρέξτε στο *Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200008661) για τη θέση του φακέλου ανάλυσης (περιέχει αναφορές σε μορφή PDF και JSON) και του φακέλου εκτέλεσης.

Πίνακα 40 Μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου αποτελεσμάτων αναφοράς του TSO Comprehensive (EU)

Τύπος εξόδου	Μέτρηση	Προδιαγραφές	Περιγραφή	Επίδραση της αποτυχίας προδιαγραφής*
Εκτέλεση αλληλούχισης	PCT_PF_READS (%)	≥80,0	Ποσοστό αναγνώσεων που διέρχονται από το φίλτρο (PF).	Η εκτέλεση αλληλούχισης ακυρώθηκε. Δεν αναφέρθηκαν αποτελέσματα για κανένα δείγμα στην εκτέλεση.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Μέσο ποσοστό των αντιστοιχίσεων βάσης με βαθμολογία ποιότητας Q30 ή υψηλότερη για την Ανάγνωση 1.	Η εκτέλεση αλληλούχισης ακυρώθηκε. Δεν αναφέρθηκαν αποτελέσματα για κανένα δείγμα στην εκτέλεση.

Τύπος εξόδου	Μέτρηση	Προδιαγραφές	Περιγραφή	Επίδραση της αποτυχίας προδιαγραφής*
	PCT_Q30_R2 (%)	≥80,0	Μέσο ποσοστό των αντιστοιχίσεων βάσης με βαθμολογία ποιότητας Q30 ή υψηλότερη για την Ανάγνωση 2.	
Βιβλιοθήκες DNA	CONTAMINATION_SCORE	≤3.106 Ή >3.106 και TIMH_P ≤0,049	Μέτρηση που αξιολογεί την πιθανότητα επιμόλυνσης με τη χρήση του VAF κοινών παραλλαγών. Η βαθμολογία επιμόλυνσης βασίζεται στην κατανομή VAF των SNP. Η τιμή P επιμόλυνσης χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση γονιδιωμάτων με υψηλό βαθμό αναδιάταξης. Ισχύει μόνο όταν η βαθμολογία μόλυνσης είναι πάνω από το ανώτερο όριο προδιαγραφών.	Δεν αναφέρθηκαν αποτελέσματα DNA.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥70	Το διάμεσο μήκος θραύσματος στο δείγμα.	Δεν αναφέρθηκαν αποτελέσματα
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (αριθμός)	≥150	Διάμεση κάλυψη θραυσμάτων εξονίου σε όλες τις βάσεις εξονίου.	TMB ή αποτελέσματα μικρών παραλλαγών DNA.
	PCT_EXON_50X (%)	≥90,0	Ποσοστιαίες βάσεις εξονίου με κάλυψη θραύσματος 50X.	

Τύπος εξόδου	Μέτρηση	Προδιαγραφές	Περιγραφή	Επίδραση της αποτυχίας προδιαγραφής*
	USABLE_MSI_SITES (αριθμός)	≥ 40	Ο αριθμός των τόπων MSI που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αντιστοιχίσεις MSI (αριθμός μικροδορυφορικών τόπων με επαρκείς παρακείμενες μετρήσεις για την ταυτοποίηση της μικροδορυφορικής αστάθειας).	Δεν αναφέρθηκαν αποτελέσματα MSI.
	COVERAGE_MAD (αριθμός)	$\leq 0,210$	Η διάμεση τιμή απόλυτων αποκλίσεων από τη διάμεση τιμή του κανονικοποιημένου αριθμού κάθε στοχευόμενης περιοχής CNV.	Δεν αναφέρθηκαν αποτελέσματα γονιδιακής ενίσχυσης.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (αριθμός)	$\geq 1,0$	Ο διάμεσος αριθμός ανεπεξέργαστων κάδων (rawbin) ανά στόχο CNV.	
Βιβλιοθήκες RNA	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Το διάμεσο μήκος θραύσματος στο δείγμα.	Δεν αναφέρθηκαν αποτελέσματα συντήξεων ή παραλλαγών ματίσματος.

Τύπος εξόδου	Μέτρηση	Προδιαγραφές	Περιγραφή	Επίδραση της αποτυχίας προδιαγραφής*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (συντελεστής)	$\leq 0,93$	Το MEDIAN_CV_GENE_500X είναι μια μέτρηση ομοιομορφίας κάλυψης. Για κάθε γονίδιο με τουλάχιστον 500x κάλυψη, υπολογίζεται ο συντελεστής διακύμανσης στην κάλυψη σε όλο το σώμα του γονιδίου. Αυτή η μέτρηση είναι η διάμεση τιμή αυτών των τιμών. Υψηλή τιμή υποδεικνύει υψηλό επίπεδο διακύμανσης και υποδεικνύει πρόβλημα στην προετοιμασία της βιβλιοθήκης, όπως προβλήματα χαμηλής εισόδου δείγματος ή/και κατακρήμνισης (pulldown) ανιχνευτών. Αυτή η μέτρηση υπολογίζεται χρησιμοποιώντας όλες τις αναγνώσεις (συμπεριλαμβανομένων των αναγνώσεων που επισημαίνονται ως διπλότυπα).	

Τύπος εξόδου	Μέτρηση	Προδιαγραφές	Περιγραφή	Επίδραση της αποτυχίας προδιαγραφής*
	TOTAL_ON_ TARGET_READS (μέτρηση)	≥9.000.000	Ο συνολικός αριθμός αναγνώσεων που αντιστοιχούν στις στοχευόμενες περιοχές. Αυτή η μέτρηση υπολογίζεται χρησιμοποιώντας όλες τις αναγνώσεις (συμπεριλαμβανομένων των αναγνώσεων που επισημαίνονται ως διπλότυπα).	

* Τα έγκυρα αποτελέσματα υποδεικνύονται με PASS (Επιτυχία).

Πίνακα 41 Μετρήσεις ελέγχου αποτελεσμάτων αναφοράς του TSO Comprehensive (EU)

Τύπος εξόδου	Μέτρηση	Προδιαγραφές	Επίδραση της αποτυχίας προδιαγραφής*
Θετικός μάρτυρας	Εξωτερικός μάρτυρας DNA	Ανιχνεύτηκαν 23 από τις 24 καθορισμένες παραλλαγές	Μη αυτόματη ακύρωση δειγμάτων ασθενών με βάση τα αποτελέσματα δειγμάτων μαρτύρων. Το λογισμικό της μονάδας ανάλυσης δεν ακυρώνει αυτόματα τα δείγματα ασθενών με βάση τα αποτελέσματα των δειγμάτων μαρτύρων.
	Εξωτερικός μάρτυρας RNA	Ανιχνεύτηκαν 12 από τις 13 καθορισμένες παραλλαγές	
Μάρτυρας χωρίς πρότυπο	Διάμεση κάλυψη εξονίου DNA για το TSO Comprehensive (EU)	≤8	Μη αυτόματη ακύρωση δειγμάτων ασθενών με βάση τα αποτελέσματα δειγμάτων μαρτύρων. Το λογισμικό της μονάδας ανάλυσης δεν ακυρώνει αυτόματα τα δείγματα ασθενών με βάση τα αποτελέσματα των δειγμάτων μαρτύρων.
	Γονίδιο RNA πάνω από τη διάμεση τιμή αποκοπής	≤1	

* Τα έγκυρα αποτελέσματα υποδεικνύονται με PASS (Επιτυχία).

- Επαναλάβετε εκτελέσεις αλληλούχισης που δεν είναι έγκυρες.
- Επαναλάβετε εξετάσεις βιβλιοθηκών με τα παρακάτω αποτελέσματα:
 - Επιμολυσμένες βιβλιοθήκες DNA

- Μη έγκυρες βιβλιοθήκες RNA
- Οι εξετάσεις μπορούν να επαναληφθούν για να ληφθούν περισσότερα αποτελέσματα παραλλαγών ή βιοδεικτών για βιβλιοθήκες DNA που ακυρώθηκαν για έναν, αλλά όχι για όλους τους τύπους παραλλαγών.
- Οι θετικοί μάρτυρες αξιολογούνται για αντιστοίχιση παραλλαγών. Εάν οι θετικοί μάρτυρες δεν πληρούν τις προδιαγραφές αντιστοίχισης παραλλαγών, ακυρώστε μη αυτόματα την εκτέλεση αλληλούχισης. Το λογισμικό της μονάδας ανάλυσης δεν ακυρώνει αυτόματα τα δείγματα ασθενών με βάση τα αποτελέσματα των δειγμάτων μαρτύρων.
- Οι NTC αξιολογούνται έναντι της διάμεσης κάλυψης εξονίου για DNA και γονιδίων πάνω από τη διάμεση τιμή αποκοπής για RNA. Εάν οι αρνητικοί μάρτυρες δεν πληρούν τις προδιαγραφές, ακυρώστε μη αυτόματα τη διαδικασία προετοιμασίας βιβλιοθήκης και όλες τις σχετικές εκτελέσεις αλληλούχισης. Το λογισμικό της μονάδας ανάλυσης δεν ακυρώνει αυτόματα τα δείγματα ασθενών με βάση τα αποτελέσματα των δειγμάτων μαρτύρων.
- Εκτελέστε πρόσθετα μέτρα ελέγχου ποιότητας σύμφωνα με τους τοπικούς, πολιτειακούς ή/και ομοσπονδιακούς κανονισμούς ή τις απαιτήσεις πιστοποίησης.

Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την επανάληψη εκτελέσεων αλληλούχισης ή εξετάσεων βιβλιοθηκών, ανατρέξτε στην ενότητα [Αντιμετώπιση προβλημάτων στη σελίδα 96](#).

Αντιμετώπιση προβλημάτων

Χρησιμοποιήστε τον παρακάτω πίνακα για την αντιμετώπιση προβλημάτων στη ροή εργασιών. Εάν μια εκτέλεση αλληλούχισης ή προετοιμασία βιβλιοθήκης για ένα δείγμα αποτύχει δύο φορές, ενδέχεται να χρειαστεί πρόσθετη αντιμετώπιση προβλημάτων. Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστ έ μνη ενέργεια
Η εκτέλεση αλληλούχισης δεν πληροί τις προδιαγραφές ποιοτικού ελέγχου της εκτέλεσης.	- Σφάλμα συγκέντρωσης - Σφάλμα αραίωσης - Ατελής θερμική αποδιάταξη των PRL/PDL - Ζητήματα με την προετοιμασία των αναλωσίμων αλληλούχισης (για παράδειγμα, δεν αποψύχονται επαρκώς, συμπυκνώσεις/υπολείμματα στην κυψελίδα ροής)	Επαναλάβετε την αλληλούχιση από την πλάκα PCR κανονικοποιημένων βιβλιοθηκών (NL). Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία για αλληλούχιση στη σελίδα 83.
	- Εσφαλμένη χρήση των ανιχνευτών εμπλουτισμού (για παράδειγμα, ανιχνευτές OPR1 που χρησιμοποιούνται για δείγματα DNA, ανιχνευτές OPD2 που χρησιμοποιούνται για δείγματα RNA) - Σφάλμα στη ροή εργασιών προετοιμασίας βιβλιοθήκης κατά τη διάρκεια ή μετά το πρώτο βήμα υβριδισμού.	Επαναλάβετε τα βήματα εμπλουτισμού για τις βιβλιοθήκες από την πλάκα PCR δειγμάτων ενισχυμένων βιβλιοθηκών (ALS). Ανατρέξτε στην ενότητα Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού στη σελίδα 65 .
	Οι απαιτήσεις για την είσοδο δειγμάτων δεν ικανοποιήθηκαν	Ξεκινήστε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από την αρχή της ροής εργασιών. Ανατρέξτε στην ενότητα Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA στη σελίδα 49 ή στην ενότητα Κατακερματισμός gDNA στη σελίδα 54 .

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστ ή μενη ενέργεια
	Σφάλμα στη ροή εργασιών προετοιμασίας βιβλιοθήκης κατά τη διάρκεια ή πριν από το βήμα PCR ευρετηρίου	Επαναλάβετε τα βήματα εμπλουτισμού για τις βιβλιοθήκες από την πλάκα PCR δειγμάτων ενισχυμένων βιβλιοθηκών (ALS). Ανατρέξτε στην ενότητα Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού στη σελίδα 65 .
	Πρόβλημα με το όργανο	Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina.
Σφάλμα με τη δημιουργία αναφοράς ή γενικό σφάλμα εργαλείου (σφάλμα δικτύου, σφάλμα κατά τη φόρτωση/εκφόρτωση αντιδραστηρίων κ.λπ.)	Πρόβλημα με το λογισμικό ή το όργανο.	Ανατρέξτε στο Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (αρ. εγγράφου 200008661) για βοήθεια σχετικά με τη δημιουργία αναφορών. Επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για πρόσθετη βοήθεια.
Η βιβλιοθήκη DNA δεν πληροί τις προδιαγραφές ποιοτικού ελέγχου.	Οι απαιτήσεις για την είσοδο δειγμάτων δεν ικανοποιήθηκαν.	Διασφαλίστε την κατάλληλη είσοδο δειγμάτων και επαναλάβετε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από το βήμα κατακερματισμού gDNA. Ανατρέξτε στην ενότητα Απαιτήσεις δειγμάτων στη σελίδα 29 Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30 .

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστ έι μενη ενέργεια
	Σφάλμα χρήσης ή εξοπλισμού στη ροή εργασιών του προσδιορισμού.	Επαναλάβετε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης ξεκινώντας από ένα από τα παρακάτω βήματα, ανάλογα με το σημείο όπου προέκυψε το πιθανολογούμενο σφάλμα χρήσης ή εξοπλισμού. Εάν παρουσιαστούν άγνωστα ή άλλα σφάλματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για την αντιμετώπιση προβλημάτων της εκτέλεσής σας. - Επαναλάβετε την αλληλούχιση από την πλάκα PCR κανονικοποιημένων βιβλιοθηκών (NL). Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία για αλληλούχιση στη σελίδα 83. - Επαναλάβετε τα βήματα εμπλουτισμού για τις βιβλιοθήκες από την πλάκα PCR δειγμάτων ενισχυμένων βιβλιοθηκών (ALS). Ανατρέξτε στην ενότητα Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού στη σελίδα 65. - Ξεκινήστε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από την αρχή της ροής εργασιών. Ανατρέξτε στην ενότητα Κατακερματισμός gDNA στη σελίδα 54.

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστ ή μενη ενέργεια
	Δεν πληρούνται τα κριτήρια CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE.	Δείτε τις Προειδοποιήσεις και τις προφυλάξεις για πληροφορίες σχετικά με την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης. Ελέγξτε τη διάταξη της πλάκας και τον ευρετηριασμό της βιβλιοθήκης για να βεβαιωθείτε ότι οι βιβλιοθήκες του ίδιου ευρετηρίου δεν υποβλήθηκαν σε αλληλούχιση μαζί. Για τις επηρεαζόμενες βιβλιοθήκες, ξεκινήστε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από την αρχή της ροής εργασιών. Ανατρέξτε στην ενότητα Κατακερματισμός gDNA στη σελίδα 54. Ενδέχεται να έχει προκύψει επιμόλυνση κατά την εκχύλιση του δείγματος. Μπορεί να χρειαστεί να επαναλάβετε την εκχύλιση για να βεβαιωθείτε ότι το δείγμα δεν έχει επιμολυνθεί.
	Αποτυχία χρησιμοποιήσιμου MSI	Ελέγξτε τις ρυθμίσεις του κατασκευαστή της συσκευής παραγωγής υπερήχων για τη χρήση και τη λειτουργία (συμπεριλαμβανομένης της στάθμης νερού και του τύπου σωληναρίων). Διασφαλίστε την κατάλληλη είσοδο δειγμάτων στον προσδιορισμό. Ανατρέξτε στην ενότητα Απαιτήσεις δειγμάτων στη σελίδα 29 Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30. Μπορεί να είναι απαραίτητη η εκχύλιση νέου δείγματος ή/και η επανάληψη του βήματος κατακερματισμού gDNA, εάν το δείγμα έχει κατακερματιστεί υπερβολικά ή έχει υποστεί ζημιά.

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστ έι μενη ενέργεια
	Το δείγμα μπορεί να έχει κατακερματιστεί υπερβολικά ή να έχει υποστεί ζημιά στα νουκλεϊκά οξέα που επηρεάζει την ικανότητα δημιουργίας επαρκών μοναδικών βιβλιοθηκών.	Ελέγξτε τις Ρυθμίσεις διαμόρφωσης συσκευής υπερήχων για κατακερματισμό DNA στη σελίδα 25 και τις ρυθμίσεις του κατασκευαστή της συσκευής παραγωγής υπερήχων για τη χρήση και τη λειτουργία (συμπεριλαμβανομένης της στάθμης νερού και του τύπου σωλήνα). Διασφαλίστε την κατάλληλη είσοδο δειγμάτων στον προσδιορισμό. Ανατρέξτε στην ενότητα Απαιτήσεις δειγμάτων στη σελίδα 29 Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30 . Μπορεί να είναι απαραίτητη η εκχύλιση νέου δείγματος ή/και η επανάληψη του βήματος κατακερματισμού gDNA, εάν το δείγμα έχει κατακερματιστεί υπερβολικά ή έχει υποστεί ζημιά.
Η βιβλιοθήκη RNA δεν πληροί τις προδιαγραφές ποιοτικού ελέγχου.	Οι απαιτήσεις για την είσοδο δειγμάτων δεν ικανοποιήθηκαν.	Διασφαλίστε την κατάλληλη είσοδο δειγμάτων και επαναλάβετε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από το βήμα αποδιάταξης και υβριδισμού RNA. Ανατρέξτε στην ενότητα Απαιτήσεις δειγμάτων στη σελίδα 29 Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30 .

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστ έι μενη ενέργεια
	Σφάλμα χρήσης ή εξοπλισμού στη ροή εργασιών του προσδιορισμού.	Επαναλάβετε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης ξεκινώντας από ένα από τα παρακάτω βήματα, ανάλογα με το σημείο όπου προέκυψε το πιθανολογούμενο σφάλμα χρήσης ή εξοπλισμού. Εάν παρουσιαστούν άγνωστα ή άλλα σφάλματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για την αντιμετώπιση προβλημάτων της εκτέλεσής σας. - Επαναλάβετε την αλληλούχιση από την πλάκα PCR κανονικοποιημένων βιβλιοθηκών (NL). Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία για αλληλούχιση στη σελίδα 83. - Επαναλάβετε τα βήματα εμπλουτισμού για τις βιβλιοθήκες από την πλάκα PCR δειγμάτων ενισχυμένων βιβλιοθηκών (ALS). Ανατρέξτε στην ενότητα Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού στη σελίδα 65. - Ξεκινήστε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από την αρχή της ροής εργασιών. Ανατρέξτε στην ενότητα Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA στη σελίδα 49.
	Το δείγμα μπορεί να έχει κατακερματιστεί υπερβολικά ή να έχει υποστεί ζημιά στα νουκλεϊκά οξέα που επηρεάζει την ικανότητα δημιουργίας επαρκών μοναδικών βιβλιοθηκών.	Διασφαλίστε την κατάλληλη είσοδο δειγμάτων. Ανατρέξτε στην ενότητα Απαιτήσεις δειγμάτων στη σελίδα 29 Εκχύλιση, ποσοτικοποίηση και αποθήκευση νουκλεϊκών οξέων στη σελίδα 30. Μπορεί να είναι απαραίτητη η εκχύλιση νέου δείγματος, εάν το δείγμα έχει κατακερματιστεί υπερβολικά ή έχει υποστεί ζημιά.

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστ έι μενη ενέργεια
Αποτυχία θετικού μάρτυρα (DNA/RNA).	Δεν ικανοποιήθηκαν οι απαιτήσεις για την είσοδο δείγματος για τον θετικό μάρτυρα.	Διασφαλίστε την κατάλληλη είσοδο στον προσδιορισμό. Ελέγξτε τη διάταξη της πλάκας και βεβαιωθείτε ότι τα κατάλληλα αντιδραστήρια (ανιχνευτές, ευρετήρια) βρίσκονται στα κατάλληλα βοηθία. Βεβαιωθείτε ότι το δείγμα θετικού μάρτυρα έχει αποθηκευτεί σύμφωνα με την επισήμανση. Για όλα τα δείγματα που έχουν τον ίδιο θετικό μάρτυρα, επαναλάβετε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης με ένα από τα παρακάτω βήματα, ανάλογα με το πού πιθανολογείται ότι συνέβη το σφάλμα χρήσης ή το σφάλμα του εξοπλισμού. Εάν παρουσιαστούν άγνωστα ή άλλα σφάλματα, επικοινωνήστε με το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της Illumina για την αντιμετώπιση προβλημάτων της εκτέλεσής σας. - Επαναλάβετε την αλληλούχιση από την πλάκα PCR κανονικοποιημένων βιβλιοθηκών (NL). Ανατρέξτε στην ενότητα Προετοιμασία για αλληλούχιση στη σελίδα 83. - Επαναλάβετε τα βήματα εμπλουτισμού για τις βιβλιοθήκες από την πλάκα PCR δειγμάτων ενισχυμένων βιβλιοθηκών (ALS). Ανατρέξτε στην ενότητα Ρύθμιση πρώτου υβριδισμού στη σελίδα 65. - Ξεκινήστε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από την αρχή της ροής εργασιών. Ανατρέξτε στην ενότητα Αποδιάταξη και υβριδοποίηση RNA στη σελίδα 49 ή στην ενότητα Κατακερματισμός gDNA στη σελίδα 54.
	Σφάλμα χρήσης ή εξοπλισμού στη ροή εργασιών του προσδιορισμού.	

Παρατήρηση	Πιθανή αιτία	Συνιστώμενη ενέργεια
Αποτυχία NTC (DNA/RNA).	Παρουσιάστηκε διασταυρούμενη μόλυνση ή επιμόλυνση της περιοχής εργασίας.	Ανατρέξτε στην ενότητα Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις για πληροφορίες σχετικά με την απολύμανση των χώρων εργασίας και την αποφυγή διασταυρούμενης μόλυνσης. Ελέγξτε τη διάταξη της πλάκας και τον ευρετηριασμό της βιβλιοθήκης για να βεβαιωθείτε ότι οι βιβλιοθήκες του ίδιου ευρετηρίου δεν υποβλήθηκαν σε αλληλούχηση μαζί. Επαναλάβετε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης από την αρχή της ροής εργασιών για όλες τις βιβλιοθήκες που μοιράζονται μάρτυρα χωρίς πρότυπο.
Το λογισμικό υποδεικνύει ότι θετικοί ή/και αρνητικοί μάρτυρες δεν συμπεριλήφθηκαν στην εκτέλεση αλληλούχησης.	Εσφαλμένη εκχώρηση του τύπου καρκίνου στον προγραμματισμό της εκτέλεσης Local Run Manager.	Επανατοποθετήστε στην ουρά την ανάλυση με σωστά προσδιορισμένους μάρτυρες σύμφωνα με τις οδηγίες στον Οδηγό ροής εργασιών της μονάδας ανάλυσης (ανατρέξτε στον <i>Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)</i> (αρ. εγγράφου 200008661)).

Χαρακτηριστικά απόδοσης

TSO Comprehensive (EU) Το είναι ένα στοχευμένο πάνελ NGS που ανιχνεύει μεταβολές σε 517 γονίδια. Μικρές παραλλαγές DNA (παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου (SNV), πολυνουκλεοτιδικές παραλλαγές (MNV), προσθήκες και διαγραφές) είναι κατάλληλες για αναφορά και από τα 517 γονίδια. Το φορτίο των μεταλλάξεων του όγκου αναφέρεται ως βαθμολογία με βάση έναν αριθμό σωματικών παραλλαγών μη οδηγών ανά μεγαβάση (ανατρέξτε στην *Οδηγός ροής εργασιών μονάδας ανάλυσης Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (αρ. εγγράφου 200008661) για λεπτομέρειες). Το MSI αναφέρεται ως κατάσταση. Οι γονιδιακές ενισχύσεις είναι κατάλληλες για αναφορά από τα γονίδια MET και ERBB2. Οι συντήξεις είναι κατάλληλες για αναφορά από τα 23 γονίδια που υποδεικνύονται στη [Συνοπτική επεξήγηση και παρουσίαση του προσδιορισμού στη σελίδα 1](#). Οι παραλλαγές ματίσματος είναι κατάλληλες για αναφορά από τα γονίδια MET και EGFR. Για να αναφερθούν, οι παραλλαγές πρέπει να ανιχνευτούν και να έχουν στοιχεία στην KB του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) και να είναι πληρούν τις προϋποθέσεις με βάση τον τύπο του ιστού που εξετάστηκε. Για να αναφερθούν, οι συντήξεις NTRK απαιτούν ο εταίρος σύντηξης να είναι 5' και η περιοχή κίνησης NTRK να είναι άθικτη.

Για μικρές παραλλαγές DNA, διεξήχθη μια αντιπροσωπευτική προσέγγιση για επικύρωση των στοχευόμενων γονιδίων στο πάνελ με δεδομένα που αντιπροσωπεύουν SNV, MNV, προσθήκες και διαγραφές. Για γονιδιακές ενισχύσεις, συντήξεις και παραλλαγές ματίσματος, η εξέταση πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο γονιδίου. Τα TMB και MSI αξιολογήθηκαν όπου ενδείκνυται. Για τις αξιώσεις CDx των συντήξεων NTRK, οι συντήξεις σε δείγματα FFPE εξετάστηκαν σε μελέτες που επικεντρώθηκαν στις ειδικές για την αξίωση επιδόσεις (όπως το όριο ανίχνευσης, η ενδοεργαστηριακή ακρίβεια, η αναπαραγωγιμότητα, η ακρίβεια και οι κλινικές επιδόσεις).

Ο Πίνακας 42 παραθέτει ορισμούς των μετρήσεων που υπολογίζονται σε διάφορες μελέτες.

Πίνακας 42 Ορισμοί μετρήσεων

Όρος	Ορισμός
Θετικό ποσοστό συμφωνίας (PPA)	Το ποσοστό των θετικών που ταυτοποιήθηκαν σωστά από το σύνολο των θετικών σε σχέση με μια ορθογώνια μέθοδο.
Αρνητικό ποσοστό συμφωνίας (NPA)	Το ποσοστό των αρνητικών που ταυτοποιήθηκαν σωστά από το σύνολο των αρνητικών σε σχέση με μια ορθογώνια μέθοδο.
Συνολικό ποσοστό συμφωνίας (OPA)	Το ποσοστό των θετικών και των αρνητικών που ταυτοποιήθηκαν σωστά από τη συνολική παρατήρηση σε σχέση με μια ορθογώνια μέθοδο.
Ποσοστό θετικών αντιστοιχίσεων (PPC)	Ποσοστό παρατηρήσεων που είναι θετικές για έναν στόχο μεταξύ των παρατηρήσεων που αναμένεται να είναι θετικές για τον στόχο.
Ποσοστό αρνητικών αντιστοιχίσεων (PNC)	Ποσοστό παρατηρήσεων που είναι αρνητικές για έναν στόχο μεταξύ των παρατηρήσεων που αναμένεται να είναι αρνητικές για τον στόχο.
n/N	Ο αριθμός των θετικών ή αρνητικών παρατηρήσεων (n) δια του συνολικού αριθμού παρατηρήσεων (N) για τον υπολογισμό της PPC ή του PNC, αντίστοιχα. Οι τιμές των n και N μπορούν να είναι σε διαφορετικά επίπεδα (π.χ. παραλλαγή ή γονίδιο) ή σε συνδυασμό μεταξύ μιας ομάδας (π.χ., SNV).
Τυπική απόκλιση (SD)	Ένα μέτρο της ποσότητας διακύμανσης των τιμών μιας μεταβλητής γύρω από τη μέση τιμή της.
Ποσοστιαίος συντελεστής διακύμανσης (%CV)	Η τυπική απόκλιση διαιρείται με τη μέση τιμή ως ποσοστό.

Διασταυρούμενη μόλυνση

Η μελέτη διασταυρούμενης μόλυνσης διεξήχθη για να αξιολογηθεί εάν προκύπτουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω επιμόλυνσης μεταξύ των βοθρίων κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της βιβλιοθήκης δειγμάτων ή επιμόλυνσης μεταξύ των εκτελέσεων διαδοχικής αλληλούχησης. Αυτή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για μικρές παραλλαγές DNA (οι οποίες επηρεάζουν επίσης το TMB), συντήξεις, γονιδιακές ενισχύσεις και MSI. Προετοιμάστηκαν βιβλιοθήκες χαρακτηρισμένα δείγματα σε διάταξη πίνακα ελέγχου με εναλλασσόμενα δείγματα για την αξιολόγηση της επιμόλυνσης μεταξύ βοθρίων και με εναλλασσόμενα ευρετήρια για την αξιολόγηση της επιμόλυνσης μεταξύ εκτελέσεων αλληλούχησης κατά τη διαδοχική αλληλούχηση στο ίδιο όργανο NextSeq 550Dx. Η μελέτη διασταυρούμενης μόλυνσης έδειξε μηδενικά συμβάντα επιμόλυνσης που παρατηρήθηκαν με την εξέταση των ανιχνευμένων παραλλαγών σε κάθε δείγμα, χωρίς την ανίχνευση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Για τον TSO Comprehensive (EU) προσδιορισμό σχεδιάστηκαν δύο μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου (CONTAMINATION_SCORE και P_VALUE) για την ανίχνευση μόλυνσης δείγματος σε δείγματα DNA. Αξιολογήθηκε η ευαισθησία ανίχνευσης μολύνσεων. Τα δείγματα FFPE DNA όγκου αναμίχθηκαν με διάφορες ποσότητες δειγμάτων FFPE φυσιολογικού DNA για τη δημιουργία σκόπιμα μολυσμένων δειγμάτων.

Συνολικά, παρήχθησαν 1112 παρατηρήσεις επιμόλυνσης και ανιχνεύτηκε επιμόλυνση στο 95% (1054) των παρατηρήσεων. Το ποσοστό ανίχνευσης αυξήθηκε στο 96% (939/976) όταν το ποσοστό μόλυνσης ήταν μεταξύ 10% και 90% (μάζα/μάζα). Από τις 37 παρατηρήσεις μεταξύ 10% και 90% μόλυνσης όπου δεν ανιχνεύτηκε μόλυνση, 12 δεν πληρούσαν την προδιαγραφή κάλυψης για αντιστοίχιση μικρών παραλλαγών DNA. Η χαμηλή κάλυψη παρεμποδίζει την ανίχνευση μόλυνσης, αλλά δεν αναφέρονται μικρές παραλλαγές DNA που να μετριάζουν οποιαδήποτε επίδραση της μόλυνσης. Δεκαπέντε παρατηρήσεις δεν πληρούσαν τις προδιαγραφές γονιδιακής ενίσχυσης (τιμή μέτρησης ποιοτικού ελέγχου διάμεσου αριθμού κάδων) για αντιστοιχίσεις γονιδιακής ενίσχυσης. Δεν θα αναφερθεί κανένα αποτέλεσμα για γονιδιακή ενίσχυση για τα δείγματα.

Η μελέτη κατέδειξε ότι ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) αναμένεται να έχει χαμηλή εμφάνιση διασταυρούμενης μόλυνσης από βοθρίο σε βοθρίο ή από εκτέλεση σε εκτέλεση. Αυτά τα αποτελέσματα μαζί με τις μετρήσεις επιμόλυνσης στο λογισμικό μετριάζουν τον κίνδυνο ψευδών αποτελεσμάτων παραλλαγής λόγω μόλυνσης του δείγματος.

Αξιολόγηση του κιτ εκχύλισης νουκλεϊκ ίν οξέ ι ν

Τρία εμπορικά διαθέσιμα κιτ εκχύλισης DNA και RNA αξιολογήθηκαν με το TSO Comprehensive (EU). Τα τρία κιτ εκχύλισης απομόνωσαν τόσο DNA όσο και RNA από τις ίδιες τομές ιστού FFPE. Τα κιτ διέφεραν στα βήματα του παράγοντα αποπαραφίνωσης και δέσμευσης νουκλεϊκών οξέων (Πίνακα 43). Το κιτ 1 ήταν το κύριο κιτ εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιδόσεων του TSO Comprehensive (EU).

Πίνακα 43 Χαρακτηριστικά του κιτ

Κιτ	Παράγοντας αποπαραφίνισης	Δέσμευση νουκλεϊκί ν οξέ ν
1	Ιδιόκτητο	Στήλη
2	Ξυλένιο	Στήλη
3	Ορυκτέλαιο	Μαγνητικά σφαιρίδια

Ο Πίνακα 44 και ο Πίνακα 45 συνοψίζουν τις επιδράσεις των κιτ εκχύλισης στην εγκυρότητα της βιβλιοθήκης και στις αντιστοιχίσεις παραλλαγών. Η διαφορά αναφερόταν, εάν οι μέσες τιμές του κιτ εκχύλισης ήταν σημαντικά διαφορετικές. Οι μέσες διαφορές μεταξύ των κιτ εκχύλισης υπολογίστηκαν με το κιτ 1 ως μάρτυρα, καθώς το κιτ 1 χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή των περισσότερων νουκλεϊκών οξέων που χρησιμοποιήθηκαν για αναλυτικές μελέτες στο TSO Comprehensive (EU). Η μέση διαφορά σε σχέση με το Κιτ 1 αναφέρθηκε ότι απεικονίζει τον τρόπο με τον οποίο διαφορετικά κιτ εκχύλισης θα επηρέαζαν τις άλλες αναλυτικές μελέτες στο TSO Comprehensive (EU).

Πίνακα 44 Επιπτώσεις κιτ εκχύλισης στην εγκυρότητα της βιβλιοθήκης

Τύπος παραλλαγής	Μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου βιβλιοθήκης	Μέση διαφορά σε σχέση με το κιτ 1
Μικρές παραλλαγές DNA/TMB	Διάμεση κάλυψη εξονίου (αριθμός) PCT Exon50X (%) Median Insert Size (bp)	Κιτ 2 χαμηλότερο κατά 56 αναγνώσεις Κιτ 3 υψηλότερο κατά 0,298% Κιτ 2 και Κιτ 3 χαμηλότερα κατά 3 bp
MSI DNA	Χρησιμοποιήσιμοι τύποι MSI	Κιτ 3 υψηλότερο κατά 8 τύπους
Γονιδιακή ενίσχυση DNA	Coverage MAD (αριθμός) Διάμεσος αριθμός κάδων	Κιτ 2 χαμηλότερο κατά 0,0043 Κιτ 2 χαμηλότερο κατά 0,5825, Κιτ 3 υψηλότερο κατά 0,3086
RNA (Παραλλαγές συντήξεων/ματίσματος)	Median Insert Size (bp) Αρχείο καταγραφής (Διάμεσο CV Gene500X) Σύνολο στις αναγνώσεις στόχου	Κιτ 3 υψηλότερο κατά 2 bp Κιτ 2 υψηλότερο κατά 0,029 Καμία σημαντική διαφορά

Παρατηρήθηκε ότι τα κιτ εκχύλισης 2 και 3 έχουν αυξημένες υποστηρικτικές αναγνώσεις, έτσι ώστε οι παραλλαγές σύντηξης και ματίσματος κοντά στο LoD να έχουν υψηλότερη πιθανότητα ανίχνευσης λόγω της επιλογής του κιτ εκχύλισης.

Πίνακα 45 Επιπτώσεις kit εκχύλισης στην εγκυρότητα στην αντιστοίχιση παραλλαγών

Τύπος παραλλαγής (μονάδες)	Αντιστοίχιση παραλλαγής (Μέση διαφορά σε σχέση με το kit 1)
Μικρές παραλλαγές DNA (VAF)	Μη τεχνικά σημαντικό Στοχευμένες παραλλαγές: η διακύμανση μεταξύ των kit ήταν μικρή σε σχέση με την υπολειπόμενη Μη στοχευμένες παραλλαγές: Δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές για τους δύο πρώτους κάδους VAF. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές όταν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα.
TMB (μετάλλαξη ανά μεγαβάση)	Μη τεχνικά σημαντική, η διακύμανση μεταξύ kit ήταν μικρή σε σχέση με την υπολειπόμενη
MSI (% ασταθών τύπων)	Kit 3 χαμηλότερο κατά 1,9% ασταθείς τύπους
Γονιδιακή ενίσχυση (fold change)	Kit 2 (0,06) και Kit 3 (0,08) υψηλότερη fold change
Συντήξεις (υποστηρικτικές αναγνώσεις)	Το Kit 2 είχε 51% και το Kit 3 είχε 23% αύξηση στις υποστηρικτικές αναγνώσεις
Παραλλαγές ματίσματος (υποστηρικτικές αναγνώσεις)	Το Kit 2 και το Kit 3 είχαν 48% αύξηση στις υποστηρικτικές αναγνώσεις

Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Αξιολογήθηκε η επίδραση πιθανών ενδογενών και εξωγενών ουσιών στην απόδοση του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU). Ενδογενείς ουσίες (μελανίνη και αιμοσφαιρίνη) ενοφθαλμίστηκαν στα δείγματα κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων. Εξωγενείς ουσίες (αιθανόλη, ξυλένιο και πρωτεΐνάση K) ήταν παρούσες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων και ενοφθαλμίστηκαν επίσης στο κεκαθαρμένο νουκλεϊκό οξύ πριν από την προετοιμασία της βιβλιοθήκης. Όπου παρατηρήθηκε παρεμβολή με την ενοφθαλμισμένη πρωτεΐνάση K, αξιολογήθηκαν επίσης αυξημένες συγκεντρώσεις πρωτεΐνάσης K κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης. Προστέθηκαν πλεονάζοντες εκκινητές δείκτη (15% και 30%) κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της βιβλιοθήκης. Εκτός από τους εκκινητές δείκτη, προστέθηκαν ουσίες σε δείγματα FFPE από τον εγκέφαλο, τον μαστό, το παχύ έντερο, τον πνεύμονα, τον μυελοειδή θυρεοειδή, τον NSCLC, τις ωοθήκες, τον προστάτη, τους σιελογόνους αδένες, το δέρμα, τους μαλακούς ιστούς και τον ιστό του θυρεοειδούς. Εξήχθησαν οκτώ δείγματα για ανάλυση DNA και 13 για ανάλυση RNA. Για τους εκκινητές δείκτη, χρησιμοποιήθηκαν έξι δείγματα FFPE από τρεις διαφορετικούς τύπους ιστού (θυρεοειδής, ουροδόχος κύστη, κόλον) για ανάλυση DNA και πέντε δείγματα FFPE από τέσσερις διαφορετικούς τύπους ιστού (πνεύμονας, θυρεοειδής, κόλον, μαστός) για ανάλυση RNA. Υπήρχε ένας ενδογενής μάρτυρας χωρίς ενοφθαλμισμα και ρυθμιστικό διάλυμα ή εξωγενής μάρτυρας ενοφθαλμισμένος

με νερό για καθένα από τα 16 μοναδικά δείγματα. Η επίδραση της νέκρωσης αξιολογήθηκε σε ένα διαφορετικό σύνολο οκτώ δειγμάτων FFPE από ιστούς εγκεφάλου, παχέος εντέρου και πνεύμονα. Για κάθε δείγμα νέκρωσης υπήρξε μακροτεμαχισμένος μάρτυρας χωρίς νέκρωση. Για όλες τις παρεμβαλλόμενες ουσίες, εξετάστηκαν τέσσερα αντίγραφα ανά δείγμα ανά ουσία με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) και συγκρίθηκαν με την κατάσταση του αντίστοιχου μάρτυρά τους για την ανίχνευση μικρών παραλλαγών DNA, γονιδιακών ενισχύσεων, συντήξεων RNA και παραλλαγών ματίσματος RNA, καθώς και για την κατάσταση MSI και τη βαθμολογία TMB. Συμπεριλήφθηκαν παραλλαγές τόσο του CDx όσο και του προφίλ όγκου.

Ανίχνευση παραλλαγών DNA

Η μελανίνη (0,2 μg/ml), η αιμοσφαιρίνη (2 mg/ml), η αιθανόλη (5%), η πρωτεΐνωση K (0,04 mg/ml σε νουκλεϊκό οξύ) και το ξυλένιο (0,0001%) δεν προκαλούν παρεμβολή στη βαθμολογία TMB, στην κατάσταση MSI, στις μικρές παραλλαγές DNA και στις γονιδιακές ενισχύσεις.

Ανίχνευση παραλλαγών RNA

Τα δεδομένα δεν υποστηρίζουν παρεμβολή της μελανίνης (0,2 μg/ml), της αιθανόλης (5%) και του ξυλενίου (0,0001%) σε συντήξεις RNA ή σε παραλλαγές ματίσματος. Η αιμοσφαιρίνη (2 mg/ml) επηρέασε (μειωμένες υποστηρικτικές αναγνώσεις) τρεις διαφορετικές παραλλαγές ματίσματος στο γονίδιο MET. Δεν επηρεάστηκε μια παραλλαγή ματίσματος στο γονίδιο AR (τρία διαφορετικά δείγματα) και μία στο γονίδιο EGFR (ένα δείγμα). Εάν το εργαστήριο εκτελεί RNA με τον προσδιορισμό, ο ιστός με αιμοσφαιρίνη θα πρέπει να αποφεύγεται ή να ελαχιστοποιείται κατά τη λήψη τομών από το μπλοκ ιστού.

Η πρωτεΐνωση K (0,04 mg/ml σε νουκλεϊκό οξύ) παρεμβλήθηκε στις συντήξεις RNA και στις παραλλαγές ματίσματος. Η πρωτεΐνωση K εξετάστηκε στα 2,6 mg/ml και 5,2 mg/ml κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης, η οποία είναι 2x και 4x της τυπικής συγκέντρωσης σε ένα εμπορικά διαθέσιμο κιτ. Οι συντήξεις ανεστάλησαν σε 4x αλλά όχι σε 2x πρωτεΐνωση K. Οι παραλλαγές ματίσματος ανεστάλησαν σε 2x πρωτεΐνωση K. Η πρωτεΐνωση K ή ισοδύναμο ένζυμο δεν πρέπει να αυξάνεται κατά τη διάρκεια της εκχύλισης από την τυπική συγκέντρωση που παρέχεται σε ένα κιτ εκχύλισης.

Η παραλλαγή ματίσματος που υποστηρίζει τις μετρήσεις μειώνεται με 30% περίσσεια εκκινητών δείκτη, αλλά όχι με 15% περίσσεια.

Νέκρωση

Η παρουσία νεκρωτικού ιστού έως και 70% δεν προκάλεσε παρεμβολή στη βαθμολογία TMB, στην κατάσταση MSI ή στις μικρές παραλλαγές DNA. Οι παραλλαγές RNA (υποστηρικτικές αναγνώσεις) και γονιδιακής ενίσχυσης (fold change) μειώθηκε σε δείγματα με $\geq 25\%$ και $\geq 23\%$ (ανά περιοχή) νεκρωτικό περιεχόμενο στο εμβαδόν του ιστού, αντίστοιχα. Εάν οι τομές του δείγματος περιέχουν νέκρωση $\geq 23\%$ στο συνολικό εμβαδόν του ιστού, ο νεκρωτικός ιστός πρέπει να υποβληθεί σε μακροτεμαχισμό.

Σταθερότητα

Σταθερότητα σε πραγματικό χρόνο

Χρησιμοποιήθηκε σταθερότητα σε πραγματικό χρόνο για τον καθορισμό της διάρκειας ζωής του κιτ προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) όταν φυλάσσεται σύμφωνα με τις συνθήκες που αναγράφονται στην επισήμανση. Ο σχεδιασμός της μελέτης βασίστηκε στην εξέταση τριών παρτίδων αντιδραστηρίων και χρησιμοποίησε τον κλασικό σχεδιασμό της μελέτης σταθερότητας που περιγράφεται στο CLSI EP25-A. Τα κιτ αποθηκεύτηκαν σε τελική διαμόρφωση κιτ για όλη τη διάρκεια της μελέτης, σε συνθήκες φύλαξης που ορίζονται στην επισήμανση του προϊόντος. Τα κατεψυγμένα συστατικά του κιτ αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -15 °C έως -25 °C. Τα υπό ψύξη συστατικά του κιτ αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 2 °C έως 8 °C.

Τα κιτ εξετάστηκαν ως προς την εμφάνιση και τα λειτουργικά κριτήρια κυκλοφορίας των κιτ σε καθορισμένα χρονικά σημεία. Επίσης, αναλύθηκαν οι τάσεις αντιστοίχισης παραλλαγών και μετρήσεων δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου για το υλικό ποιοτικού ελέγχου. Προσδιορίστηκε η διάρκεια ζωής για κάθε αντιδραστήριο. Οι ημερομηνίες λήξης εκχωρούνται με βάση την ημερομηνία κατασκευής και τη διάρκεια ζωής. Η λήξη του κιτ εκχωρείται με βάση το αντιδραστήριο που λήγει νωρίτερα.

Σταθερότητα κατά τη χρήση του κιτ

Η σταθερότητα κατά τη χρήση του κιτ του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) αξιολογήθηκε υπό συνθήκες τυπικής χρήσης κατά τη διάρκεια ζωής του προϊόντος για την υποστήριξη πολλαπλών χρήσεων του κιτ. Το κιτ αντιδραστηρίων υποβλήθηκε σε πολλαπλές καταψύξεις/αποψύξεις και ελέγχθηκε ώστε να μπορεί να υποστηρίξει έως και 4 χρήσεις του κιτ. Επιπλέον, προετοιμάστηκαν 8 βιβλιοθήκες RNA και 8 βιβλιοθήκες DNA συνολικά 3 φορές για να εξεταστεί ο μέγιστος αριθμός βιβλιοθηκών που υποστηρίζονται (24 βιβλιοθήκες DNA και 24 βιβλιοθήκες RNA ανά κιτ). Όλα τα λειτουργικά κριτήρια κυκλοφορίας του κιτ ικανοποιήθηκαν για όλους τους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης και τα χρονικά σημεία που εξετάστηκαν. Πραγματοποιήθηκε εξέταση δειγμάτων FFPE με αντιδραστήρια ηλικίας ≥ 25 μηνών για την αξιολόγηση της επίδρασης της εξέτασης κατά τη χρήση στην αντιστοίχιση παραλλαγών. Μια ποιοτική ανάλυση των στοχευόμενων παραλλαγών καταδεικνύει ότι τα συμβάντα κατά τη χρήση δεν επηρέασαν τις αντιστοιχίσεις παραλλαγών.

Σταθερότητα νουκλεϊκ ί ν οξέ ι ν

Η σταθερότητα των νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) και η σχετιζόμενη ποσοτικοποίηση για χρήση με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) αξιολογήθηκε με τη χρήση δειγμάτων FFPE από πολλαπλούς τύπους ιστών. Τμηματοποιήθηκαν μπλοκ FFPE και εξήχθησαν όλα τα νουκλεϊκά οξέα ταυτόχρονα. Το εξαγόμενο νουκλεϊκό οξύ αναμειγνύεται ενδεδειγμένα, ποσοτικοποιείται, ελέγχεται ως προς την ποιότητα νουκλεϊκού οξέος και διαιρείται σε δύο σετ σωληναρίων μίας χρήσης που πρόκειται να καταψυχθούν για δύο χρονικά σημεία: Μάρτυρας T0 (Έναρξη) και δοκιμή T1 (≥ 28 ημέρες). Το σύνολο του εξαγόμενου RNA αποθηκεύτηκε στους -85°C έως -65°C και το σύνολο του εξαγόμενου DNA αποθηκεύτηκε στους -25°C έως -15°C για τα ενδεικνυόμενα χρονικά διαστήματα και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε επεξεργασία μέσω του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) σε πολλαπλές επαναλήψεις και από ανάλογους χειριστές. Η κατάσταση δοκιμής T1

συγκρίθηκε με τον μάρτυρα για την κατάσταση MSI, τη βαθμολογία TMB, τις γονιδιακές ενισχύσεις, τις μικρές παραλλαγές DNA, τις συντήξεις RNA και τις παραλλαγές ματίσματος RNA. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα νουκλεϊκά οξέα και η σχετιζόμενη ποσοτικοποίηση για χρήση με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) είναι σταθερά για έως και 28 ημέρες, όταν φυλάσσονται στις συνιστώμενες θερμοκρασίες (RNA στους -85°C έως -65°C και DNA στους -25°C έως -15°C).

Σταθερότητα βιβλιοθηκών

Η σταθερότητα των βιβλιοθηκών χρησιμοποιώντας καθένα από τα έξι ασφαλή σημεία διακοπής για τον προσδιορισμό (ανατρέξτε στον Πίνακα 5) αξιολογήθηκε με τη χρήση δειγμάτων FFPE από πολλαπλούς τύπους ιστών. Οι βιβλιοθήκες ελέγχου (T0, χωρίς σημεία διακοπής) ακολουθήθηκαν αμέσως στο τέλος της ροής εργασιών. Κλάσματα από τις ίδιες βιβλιοθήκες διατηρήθηκαν στα σημεία διακοπής στους -25°C έως -15°C για το χρονικό διάστημα (T1) για την υποστήριξη των ημερών που αναφέρονται στον Πίνακα 5. Η T1 συγκρίθηκε με την T0 για μικρές παραλλαγές DNA, TMB, γονιδιακές ενισχύσεις, MSI, συντήξεις RNA και παραλλαγές RNA συναρμογής με CDx και παραλλαγές προφίλ όγκου. Τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι βιβλιοθήκες που δημιουργούνται από τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) είναι σταθερές σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης.

Σταθερότητα ιστού FFPE καθηλωμένου σε αντικειμενοφόρο πλάκα

Η σταθερότητα των ιστών FFPE που είναι καθηλωμένοι σε αντικειμενοφόρους πλάκες για χρήση με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) αξιολογήθηκε με τομή των ιστοτεμαχίων FFPE (τομές 5 μm) από διάφορα μοναδικά δείγματα, καθηλωμένα σε αντικειμενοφόρους πλάκες τα οποία, στη συνέχεια, αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (22°C) για 2 χρονικά σημεία. Το RNA εξάχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -65°C έως -85°C και το DNA εξάχθηκε και αποθηκεύτηκε στους -15°C έως -25°C για λιγότερο από 1 εβδομάδα πριν από την εξέταση. Το υλικό νουκλεϊκού οξέος ποσοτικοποιείται και ακολούθως υποβάλλεται σε επεξεργασία μέσω του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) εντός 24 ωρών για κάθε χρονικό σημείο. Σε κάθε χρονικό σημείο, εξετάστηκαν πολλαπλά αντίγραφα με ανάλογους χειριστές ανά δείγμα με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) και συγκρίθηκαν με το χρονικό σημείο T0 για MSI, TMB, γονιδιακές ενισχύσεις, μικρές παραλλαγές DNA, συντήξεις RNA και παραλλαγές ματίσματος RNA, συμπεριλαμβανομένων των παραλλαγών CDx και αυτών στον προσδιορισμό προφίλ του όγκου. Αξιολογήθηκε η αντιστοίχιση παραλλαγών και πληρούνται όλα τα κριτήρια αποδοχής, υποδεικνύοντας ότι οι καθηλωμένοι σε αντικειμενοφόρο πλάκα ιστοί FFPE για χρήση με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) είναι σταθεροί σε θερμοκρασία δωματίου για έως και 4 εβδομάδες (28 ημέρες). Σημειώνεται ότι ανιχνεύθηκε μείωση κατά 10% στο ποσοστό εγκυρότητας του QC της βιβλιοθήκης MSI μετά από 4 εβδομάδες (28 ημέρες) λόγω ενός συνδυασμού χειριστή και χρόνου αποθήκευσης. Οι συντήξεις RNA και οι παραλλαγές ματίσματος είχαν περίπου 29% μείωση στις υποστηρικτικές αναγνώσεις μετά την αποθήκευση σε αντικειμενοφόρους πλάκες για 4 εβδομάδες (28 ημέρες).

Προστατευτική ζήτηση τιτλοποίησης εισόδου νουκλεϊκ όξιν

Η είσοδος νουκλεϊκών οξέων για τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) αξιολογήθηκε με την εξέταση DNA από 33 δείγματα FFPE που περιλάμβαναν 17 τύπους ιστών, σε επίπεδα εισόδου που κυμαίνονται από 10 ng έως 500 ng και με την εξέταση RNA από 5 δείγματα FFPE από 5 τύπους ιστών σε επίπεδα εισόδου που κυμαίνονται από 10 ng έως 85 ng. Αξιολογήθηκαν οι μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου βιβλιοθήκης οι οποίες ήταν εξαρτώμενες από το δείγμα. Τα αποτελέσματα DNA κατέδειξαν ότι ορισμένες, αλλά όχι όλες οι μετρήσεις ποιοτικού ελέγχου δείγματος DNA ανταποκρίνονται σε αυξημένη είσοδο πάνω από την ονομαστική είσοδο 40 ng:

- Το MEDIAN_INSERT_SIZE δεν ανταποκρίθηκε σε είσοδο άνω των 30 ng.
- Το MEDIAN_EXON_COVERAGE κατέδειξε θετικό συσχετισμό με την αύξηση της εισόδου.
- Το PCT_EXON_50X αυξήθηκε με την αύξηση της εισόδου έως και 80 ng.
- Τα USABLE_MSI_SITES αυξήθηκαν με την αύξηση της εισόδου. Ορισμένα δείγματα με λιγότερα από 40 USABLE_MSI_SITES στα 40 ng πληρούσαν την προδιαγραφή σε υψηλότερες εισόδους, γεγονός που θα επέτρεπε τον υπολογισμό μιας βαθμολογίας MSI.
- Το MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET αυξήθηκε με την αύξηση της εισόδου.
- Αύξηση της εισόδου για αύξηση του COVERAGE_MAD προς το ανώτερο όριο προδιαγραφών.

Οι μετρήσεις QC δείγματος RNA αυξήθηκαν (MEDIAN_INSERT_SIZE και TOTAL_ON_TARGET_READS) ή μειώθηκαν (MEDIAN_CV_GENE_500X) από 10 ng σε 40 ng αλλά γενικά δεν άλλαξαν μεταξύ των εισόδων 40 ng και 85 ng.

Όριο τυφλού

Το ποσοστό των ψευδώς θετικών (από τα συνολικά αναμενόμενα αρνητικά) αξιολογήθηκε με επαναληπτική εξέταση φυσιολογικού ή καλοήθους FFPE, παρακείμενου ιστού που δεν θα πρέπει να περιέχει σωματικές παραλλαγές για μικρές παραλλαγές DNA, γονιδιακές ενισχύσεις, MSI, συντήξεις RNA και παραλλαγές ματίσματος RNA. Δεν αναλύθηκαν ψευδώς θετικά αποτελέσματα για TMB, καθώς δεν υπάρχει κλινική τιμή αποκοπής. Έξι δείγματα FFPE DNA και 6 RNA αναλύθηκαν εις διπλούν με 2 χειριστές σε 3 ημέρες για καθεμία από τις 2 παρτίδες αντιδραστηρίων. Ένα υποσύνολο δειγμάτων συγκεντρώθηκε εκ νέου και υποβλήθηκε εκ νέου σε αλληλούχιση σε μορφή 3x DNA μόνο και 3x RNA μόνο για την αξιολόγηση ψευδώς θετικών με αρκετές πολλαπλές διαμορφώσεις που υποστηρίζονται από αυτήν τη συσκευή. Επιπλέον, αναλύθηκαν 30 επιπλέον δείγματα RNA εις διπλούν, τα οποία υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με 1 παρτίδα αντιδραστηρίων, διαιρεμένα μεταξύ 2 χειριστών. Συνολικά, υπήρχαν 168 πιθανές παρατηρήσεις για το DNA και 228 παρατηρήσεις για το RNA μειωμένες από μη έγκυρες βιβλιοθήκες για κάθε τύπο παραλλαγής. Το ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων υπολογίστηκε στο επίπεδο γονιδίου για ενισχύσεις και στο επίπεδο θέσης (περίπου 1,9 εκατομμύρια θέσεις) για μικρές παραλλαγές DNA. Το ποσοστό των ψευδώς θετικών για τύπους παραλλαγών DNA παρουσιάζεται στον [Πίνακα 46](#). Το TSO Comprehensive (EU) δεν έχει αξιώσεις CDx (Επίπεδο 1) για μικρές παραλλαγές DNA, οπότε δεν μπορούν να αναφερθούν ψευδώς θετικά για τις μικρές

παραλλαγές DNA για το Επίπεδο 1. Τα 271 ψευδώς θετικά αποτελέσματα ισοπεδώθηκαν με τη Βάση Γνώσεων TSO Comprehensive (EU). Κανένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα δεν ήταν κλινικά σημαντικό (Επίπεδο 2). Υπήρξαν 4 ψευδώς θετικά αποτελέσματα στο επίπεδο 3 που προέκυψαν από 2 παραλλαγές σε 4 (2,4%) παρατηρήσεις από τις 168 παρατηρήσεις. Το ποσοστό των ψευδώς θετικών για συντήξεις RNA και παραλλαγές ματίσματος ήταν 0%, όπως φαίνεται στον Πίνακα 47.

Πίνακα 46 Ψευδώς θετικά ανά τύπο παραλλαγής DNA

Τύπος παραλλαγής	Ψευδώς θετικά
Γονιδιακές ενισχύσεις	0% (0/9912)
Μικρές παραλλαγές DNA	0,0001% (271/295.801.567)
MSI	0% (0/156)
TMB	Δ/Ι*

* Τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα δεν ισχύουν επειδή το TMB αναφέρεται ως βαθμολογία και δεν έχει ποιοτική έκβαση.

Πίνακα 47 Ψευδώς θετικά ανά τύπο παραλλαγής RNA

Τύπος παραλλαγής	Ψευδώς θετικά
Σύντηξη	0% (0/227)
Παραλλαγή ματίσματος	0% (0/227)

Όριο ανίχνευσης

Διεξήχθησαν δύο μελέτες για την αξιολόγηση των ορίων ανίχνευσης για το TSO Comprehensive (EU). Η Μελέτη 1 αξιολόγησε τις μικρές παραλλαγές DNA του RET, τις συντήξεις RET και τις συντήξεις NTRK1–3. Η Μελέτη 2 αξιολόγησε άλλες παραλλαγές προσδιορισμού του προφίλ όγκου.

Μελέτη 1

Προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (LoD) των μικρών παραλλαγών DNA NTRK1, NTRK3 και RET και των συντήξεων NTRK1–3 και RET. Το LoD είναι η χαμηλότερη τιμή του προσδιοριζόμενου στοιχείου (για παράδειγμα, συχνότητα αλληλόμορφων παραλλαγής ή υποστηρικτικές αναγνώσεις) που μπορεί να ανιχνευτεί σταθερά (όριο ανίχνευσης 95% ή σφάλμα τύπου II 5%). Ιστοί FFPE με μικρές παραλλαγές DNA RET (μυελικός καρκίνος του θυρεοειδούς), συντήξεις RET (θηλώδες καρκίνωμα του θυρεοειδούς, άτυπος όγκος Spitz) και συντήξεις NTRK1–3 (γλοίωμα χαμηλού βαθμού, πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, μυοϊνοβλαστικό σάρκωμα, σάρκωμα, εκκριτικός καρκίνος του μαστού, καρκίνος του παχέος εντέρου), καθώς και μια κυτταρική σειρά με επεξεργασία FFPE με μικρές παραλλαγές DNA NTRK1 και NTRK3 χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Κάθε δείγμα αραιώθηκε σε τουλάχιστον 5 επίπεδα εξέτασης (με εύρος από περίπου 0,01 – 0,10 VAF για μικρές παραλλαγές DNA και 2 – 25 υποστηρικτικές αναγνώσεις για συντήξεις). Υπήρχαν 18 παρατηρήσεις για κάθε επίπεδο εξέτασης ανά παρτίδα που παράχθηκε από 3 χειριστές και 3 όργανα αλληλούχισης που ξεκίνησαν την προετοιμασία βιβλιοθήκης σε 3 μη διαδοχικές ημέρες με 2 αντίγραφα κάθε επιπέδου εξέτασης δείγματος. Εξετάστηκαν δύο παρτίδες αντιδραστηρίων.

Για παραλλαγές DNA, οι 2 παρτίδες αναλύθηκαν ανεξάρτητα χρησιμοποιώντας παλινδρόμηση πιθανομονάδας (probit) ή την προσέγγιση ρυθμού επιτυχίας (κατώτατο επίπεδο δοκιμής με ποσοστό επιτυχίας (σημειακή εκτίμηση) $\geq 95\%$) για να προσδιοριστεί το LoD για κάθε παραλλαγή ανά παρτίδα. Το μεγαλύτερο LoD και στις δύο παρτίδες αντιδραστηρίων λήφθηκε ως το όριο ανίχνευσης για την παραλλαγή (Πίνακα 48).

Για τις συντήξεις RNA, χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές FFPE για την εκτίμηση των τιμών LoD για κάθε γονίδιο σύντηξης. Στη συνέχεια, τα LoD επαληθεύτηκαν με ιστούς FFPE χρησιμοποιώντας διπλότυπα προετοιμασιών βιβλιοθήκης από 3 χειριστές, 3 όργανα και 3 παρτίδες αντιδραστηρίων για να παραχθούν 54 παρατηρήσεις ανά παραλλαγή κοντά στο LoD που τεκμηριώθηκαν με κυτταρικές γραμμές FFPE. Τα όρια ανίχνευσης που αναφέρθηκαν για κάθε σύντηξη (Πίνακα 49) είναι οι χαμηλότερες μέσες υποστηρικτικές αναγνώσεις που έφτασαν σε ποσοστό επιτυχίας (σημειακή εκτίμηση) $\geq 95\%$.

Πίνακα 48 Όριο ανίχνευσης για μικρές παραλλαγές DNA NTRK1, NTRK3 και RET

Δείκτης	Chr ¹	Position (Θέση)	πρότυπο	Εναλλακτική	Όριο ανίχνευσης (Συχνότητα αλληλόμορφων παραλλαγής)
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 (διαγραφή) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = Χρωμόσωμα

² Αυτές οι παραλλαγές του DNA αναλύθηκαν με παλινδρόμηση πιθανομονάδας (probit). Οι άλλες παραλλαγές του DNA αναλύθηκαν με την προσέγγιση του ποσοστού επιτυχίας.

Πίνακα 49 Όριο ανίχνευσης για συντήξεις NTRK και RET

Γονίδιο	Σύντηξη	Όριο ανίχνευσης (Υποστηρικτικές αναγνώσεις)
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
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Μελέτη 2

Αξιολογήθηκαν τα όρια ανίχνευσης (LoD) των παραλλαγών προσδιορισμού προφίλ του όγκου που αναφέρθηκαν από το TSO Comprehensive (EU). Το LoD είναι η χαμηλότερη τιμή του προσδιοριζόμενου στοιχείου (συχνότητα αλληλόμορφων παραλλαγής, fold change ή υποστηρικτικές αναγνώσεις) που μπορεί να ανιχνευτεί σταθερά (όριο ανίχνευσης 95% ή σφάλμα τύπου II 5%). Δείγματα FFPE από 17 τύπους ιστών που περιείχαν παραλλαγές αραιώθηκαν σε πολλαπλά επίπεδα εξέτασης. Δημιουργήθηκαν έξι παρατηρήσεις ανά επίπεδο από δύο χειριστές, ο καθένας από τους οποίους χρησιμοποιούσε διαφορετική παρτίδα αντιδραστηρίων και όργανο.

Παραλλαγές DNA

Τα LoD 10 κατηγοριών μικρών παραλλαγών DNA (25 παραλλαγές συνολικά) και 2 γονιδιακών ενισχύσεων DNA (ERBB2 και MET) προσδιορίστηκαν και συνοψίστηκαν ως εύρη (Πίνακα 50). Περιλαμβάνονται επίσης παραλλαγές του RET από το LoD της Μελέτης 1. Δύο από τις 3 προσθήκες που ήταν μεγαλύτερες από 5 bp είχαν LoD 0,034 και 0,036 VAF, ενώ η τρίτη είχε LoD 0,215 VAF. Η τελευταία ήταν μια προσθήκη σε μια περιοχή χαμηλής πολυπλοκότητας όπου η προσθήκη προσθέτει επιπλέον επαναλήψεις, επηρεάζει την ευθυγράμμιση και απαιτεί περισσότερες αναγνώσεις για συνεπή ανίχνευση. Συνεπώς, ορισμένα γονιδιωματικά περιβάλλοντα χαμηλής πολυπλοκότητας μπορεί να επηρεάσουν την ανίχνευση προσθηκών > 5 bp.

Πίνακα 50 Όριο ανίχνευσης για μικρές παραλλαγές του DNA και γονιδιακές ενισχύσεις

Τύπος (Μονάδα μέτρησης για LoD)	Κατηγορία παραλλαγής / Γονιδιωματικό πλαίσιο	Αριθμός παραλλαγών	Εύρος (VAF)
Μικρές παραλλαγές του DNA (συχνότητα αλληλόμορφων παραλλαγής)	SNV	5	0,016–0,064
	MNV	3	0,022–0,048
	Προσθήκη (1-2 bp) κοντά σε επαναλήψεις ομοπολυμερών	2	0,086–0,104
	Προσθήκη (1-2 bp) κοντά σε επαναλήψεις δινουκλεοτιδίων	2	0,038–0,051
	Προσθήκη (3-5 bp)	2	0,030–0,056
	Εισαγωγή (> 5 bp και έως 25 bp)	3	0,034–0,215
	Διαγραφή (1-2 bp) κοντά σε επαναλήψεις ομοπολυμερών	2	0,094–0,100
	Διαγραφή (1-2 bp) κοντά σε επαναλήψεις δινουκλεοτιδίων	2	0,033–0,070
	Διαγραφή (3-5 bp)	2	0,028–0,064
	Διαγραφή (> 5 και έως 25 bp)	2	0,047–0,055
Γονιδιακές ενισχύσεις [αλλαγές στην έκφραση (fold change)]	Ανά γονίδιο (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Η ανάλυση των μη στοχευμένων παραλλαγών πραγματοποιήθηκε από δείγματα της Μελέτης 1 που είχαν τουλάχιστον πέντε επίπεδα εξέτασης. Κάθε μη στοχευμένη παραλλαγή αναλύθηκε μεμονωμένα και το LoD εκτιμήθηκε μόνο για παραλλαγές με τουλάχιστον ένα επίπεδο > 0% και ≤ 95% ποσοστό επιτυχίας και τουλάχιστον ένα επίπεδο ≥ 95% ποσοστό επιτυχίας. Ο Πίνακα 51 δείχνει τα εκατοστημόρια μαζί με τα

ελάχιστα και τα μέγιστα LoD που παρατηρούνται ανά κατηγορία για τις μη στοχευόμενες παραλλαγές. Οι μη στοχευόμενες παραλλαγές παρέχουν περισσότερες παραλλαγές ανά κατηγορία από αυτές που εξετάστηκαν στη Μελέτη 2 και συνάδουν με τα εύρη LoD από τον Πίνακα 50.

Πίνακα 51 Συνοπτικά στατιστικά στοιχεία για τα όρια ανίχνευσης ανά κατηγορία μη στοχευμένων παραλλαγών (από τη Μελέτη 1)

Κατηγορία	N	Ελάχ	25%	50%	75%	90%	Μέγ.
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
Προσθήκη	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Διαγραφή	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Συντήξεις

Τα LoD προσδιορίστηκαν για 19 συντήξεις, που αντιστοιχούσαν σε 20 γονίδια στο πάνελ TSO Comprehensive (EU), οι οποίες κυμαίνονταν από 9 έως 31,3 υποστηρικτικές αναγνώσεις (Πίνακα 52). Εξετάστηκαν 3 επιπλέον γονίδια (NTRK1 – 3) στην άλλη μελέτη. Το γονίδιο RET εξετάστηκε και εδώ και στην άλλη μελέτη. Δεκαέξι συντήξεις με προσδιορισμένα LoD είχαν δεδομένα συμβατά με κοινό LoD 16 υποστηρικτικών αναγνώσεων χρησιμοποιώντας αμφίπλευρο, ανώτερο όριο εμπιστοσύνης (UCL) 95%. Δύο συντήξεις είχαν LoD 24,7 και 31,3 υποστηρικτικές αναγνώσεις που δεν ήταν συνεπείς με το κοινό LoD.

Η σύντηξη FGFR2-SRPK2 με τιμή LoD 24,7 υποστηρικτικών αναγνώσεων είχε επαναλαμβανόμενες περιοχές επικάλυψης στο σημείο θραύσης, όπως επισημάνθηκε από το λογισμικό του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU). Οι περιοχές επανάληψης εντός ενός σημείου θραύσης συνήθως έχουν χαμηλότερα επίπεδα στοιχείων, καθώς οι αναγνώσεις μπορεί να αντιστοιχιστούν σε άλλο σημείο του γονιδιώματος ή μπορεί να παραμείνουν μη ευθυγραμμισμένες. Επιπλέον, οι επαναλαμβανόμενες περιοχές καθιστούν τη διαδικασία συναρμολόγησης (που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αλληλουχιών σύντηξης) πιο δύσκολη και απαιτούν πρόσθετα στοιχεία για τη δημιουργία της σωστής αλληλουχίας. Η SEPT14-EGFR είναι ένα άλλο παράδειγμα σύντηξης με ομόλογη αλληλουχία στο σημείο θραύσης.

Η σύντηξη BCL2-IGHJ5 με τιμή LoD 31,3 υποστηρικτικών αναγνώσεων είχε ένα πολύ βραχύ γονίδιο (IGHJ5) με το σημείο θραύσης κοντά στις αρχές ενός εξονίου που απαιτεί βραχείς ευθυγραμμίσεις με κενά. Συνεπώς, για συνεπή ανίχνευση απαιτούνταν περισσότερες αναγνώσεις.

Πίνακα 52 Όριο ανίχνευσης για συντήξεις

Σύντηξη	Σημείο θραύσης γονιδίου A	Σημείο θραύσης γονιδίου B	LoD	Κοινό LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	ναι
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	ναι
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	ναι

Σύντηξη	Σημείο θραύσης γονιδίου A	Σημείο θραύσης γονιδίου B	LoD	Κοινό LoD
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	ναι
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	ναι
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	ναι
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	ναι
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	ναι
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	ναι
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	ναι
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	όχι
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	ναι
CD74-ROS1,GOPC	149784243	117645578	9,2	ναι
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	ναι
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	ναι
DHX8,ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	ναι
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	ναι
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	όχι
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	ναι

Παραλλαγές ματίσματος

Οι δύο παραλλαγές ματίσματος RNA, MET και EGFR, είχαν LoD 18,7 και 16,7 υποστηρικτικών αναγνώσεων, αντίστοιχα.

Περιεχόμενο του όγκου

Τα αποτελέσματα της μελέτης δικαιολογούν τις συστάσεις για το περιεχόμενο όγκου για κλινικά δείγματα. Γενικά, όσο μεγαλύτερο είναι το περιεχόμενο του όγκου, τόσο υψηλότερο είναι το «σήμα» (VAF, fold-change ή υποστηρικτικές αναγνώσεις) για παραλλαγές στον όγκο. Οι συστάσεις για το ελάχιστο περιεχόμενο του όγκου βασίζονται στις ακόλουθες παρατηρήσεις. Οι τιμές LoD για μικρές παραλλαγές DNA δεν είναι μεγαλύτερες από 0,104 VAF (με εξαίρεση την προσθήκη TP53). Για την ανίχνευση μεταλλάξεων-οδηγών στον όγκο (συχνότητα αλληλόμορφων παραλλαγής 0,50), συνιστάται περιεχόμενο όγκου 20%, έτσι ώστε αυτές οι μεταλλάξεις να έχουν VAF 0,10 και να βρίσκονται στο επίπεδο του LoD ή πάνω από αυτό. Στο 20% του περιεχομένου του όγκου, τα γονίδια που ενισχύονται με αλλαγές στην έκφραση (fold change) 5,5 (11

αντίγραφα), θα ανιχνεύονται με συνέπεια με βάση ένα όριο ανίχνευσης με αλλαγές στην έκφραση (fold change) 1,8. Στο 20% του περιεχομένου του όγκου, οι συντήξεις με 74 υποστηρικτικές αναγνώσεις θα ανιχνεύονται με συνέπεια με βάση ένα όριο ανίχνευσης 14.7 υποστηρικτικών αναγνώσεων.

Αναπαραγωγικότητα

Διεξήχθησαν δύο μελέτες για την αξιολόγηση της αναπαραγωγικότητας για τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU). Η Μελέτη 1 αξιολόγησε τις μικρές παραλλαγές DNA στο RET επιπλέον των παραλλαγών σύντηξης NTRK και RET. Η Μελέτη 2 αξιολόγησε πρόσθετες παραλλαγές προσδιορισμού του προφίλ όγκου.

Μελέτη 1

Αυτή η μελέτη πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αναπαραγωγικότητας του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) σε 3 κέντρα εξέτασης (1 εσωτερικό, 2 εξωτερικά) με 2 χειριστές ανά κέντρο, 2 αντίγραφα εντός της εκτέλεσης και 3 ημέρες μη διαδοχικών εξετάσεων. Η εξέταση πραγματοποιήθηκε με ένα πάνελ αναπαραγωγικότητας που περιλαμβάνει δείγματα DNA που περιέχουν ειδικές γνωστές μικρές παραλλαγές DNA στο RET και δείγματα RNA που περιέχουν ειδικές γνωστές παραλλαγές NTRK1–3 και σύντηξης RET από δείγματα ιστού και κυτταρικές σειρές μονιμοποιημένα σε φορμαλίνη και εγκλεισμένα σε παραφίνη (FFPE). Το πάνελ περιείχε μέλη του πάνελ DNA και RNA με χαμηλά επίπεδα παραλλαγής και υψηλά επίπεδα παραλλαγής με τον ίδιο αριθμό μελών πάνελ χαμηλού και υψηλού επιπέδου για κάθε κατηγορία παραλλαγής. Τα μέλη του πάνελ υψηλού επιπέδου στοχευοποιήθηκαν σε περίπου 2 έως 3 φορές το LoD και τα μέλη του πάνελ χαμηλού επιπέδου στοχευοποιήθηκαν σε περίπου το LoD. Σε κάθε κέντρο, κάθε χειριστής εξέτασε τα μέλη του πάνελ εις διπλούν 3 φορές, παράγοντας 6 παρατηρήσεις ανά στόχο, ανά μέλος του πάνελ. Από τα συνολικά 3 κέντρα, παρήχθησαν 36 παρατηρήσεις ανά μέλος του πάνελ (3 κέντρα/όργανα × 2 χειριστές × 2 αντίγραφα δειγμάτων εντός εκτέλεσης × 3 ημέρες έναρξης).

Τα PPC και τα PNC για στοχευόμενες μικρές παραλλαγές DNA και στοχευόμενες παραλλαγές σύντηξης RNA στο υψηλό επίπεδο προσδιορίστηκαν ως τα πρωτεύοντα τελικά σημεία. Τα PPC και τα PNC για στοχευόμενες μικρές παραλλαγές DNA και στοχευόμενες παραλλαγές σύντηξης RNA στο χαμηλό επίπεδο υπολογίστηκαν ως δευτερεύοντα τελικά σημεία. Τα αμφίπλευρα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) 95% που σχετίζονται με όλα τα τελικά σημεία υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο βαθμολογίας Wilson. Πραγματοποιήθηκαν πρωτεύουσες αναλύσεις για την εκτίμηση των PPC και PNC (με τα σχετιζόμενα CI 95%) στα στοχευόμενα μέλη του πάνελ υψηλού επιπέδου, συνδυάζοντας τις παρατηρήσεις του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για έναν δεδομένο στόχο σε μια ομάδα μελών του πάνελ που αντιπροσωπεύουν την ισχύουσα κατηγορία παραλλαγών (για παράδειγμα, μικρές παραλλαγές DNA και συντήξεις RNA) σε όλα τα κέντρα/όργανα, χειριστές και εκτελέσεις. Για κάθε στοχευόμενη παραλλαγή, οι παρατηρήσεις του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) σε άλλα μέλη του πάνελ στο υψηλό επίπεδο που στοχεύονται για τον ίδιο τύπο παραλλαγής, αλλά που δεν περιέχουν την ίδια παραλλαγή όπως προσδιορίζεται από τον κανόνα της πλειοψηφίας, συνδυάστηκαν με το υπολογισμένο PNC. Το συνολικό PPC και PNC για τα στοχευόμενα μέλη του πάνελ χαμηλού επιπέδου προσδιορίστηκαν με παρόμοιο τρόπο.

Μικρές παραλλαγές DNA στο RET

Για τα μέλη του πάνελ μικρών παραλλαγών DNA υψηλού επιπέδου, το συνολικό PPC ήταν 100,0% (207/207, 95% CI: 98,2% έως 100,0%) (Πίνακα 53). Το συνολικό PNC για τα μέλη του πάνελ μικρών παραλλαγών DNA υψηλού επιπέδου ήταν 100,0% (1035/1035, 95% CI: 99,6% έως 100,0%) (Πίνακα 54). Για τα μέλη του πάνελ μικρών παραλλαγών DNA χαμηλού επιπέδου, το συνολικό PPC για τα μέλη του στοχευόμενου πάνελ μικρών παραλλαγών DNA χαμηλού επιπέδου ήταν 99,1% (210/212, 95% CI: 96,6% έως 99,7%) και το συνολικό PNC ήταν 100,0% (1026/1026, 95% CI: 99,6% έως 100,0%).

Πίνακα 53 PPC του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση μικρών παραλλαγών DNA στο RET σε στοχευόμενα μέλη του πάνελ υψηλού και χαμηλού επιπέδου

Επίπεδο παραλλαγής	Τύπος παραλλαγής	Στοχευόμενη παραλλαγή (νουκλεοτίδιο)	Στοχευόμενη παραλλαγή (αμινοξύ)	N	Μέση 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)
	Διαγραφή	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Προσθήκη	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Υψηλό	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Υψηλό	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Υψηλό	207	Δ/I 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)
	Διαγραφή	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Προσθήκη	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Χαμηλό	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Χαμηλό	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Χαμηλό	212	Δ/I ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Συντμήσεις: Δ/I: δεν ισχύει, VAF: συχνότητα αλληλόμορφων παραλλαγής.

² Αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου βαθμολογίας Wilson.

Πίνακα 54 PNC του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση μικρών παραλλαγών DNA στο RET σε στοχευόμενα μέλη του πάνελ υψηλού και χαμηλού επιπέδου

Επίπεδο παραλλαγής	Τύπος παραλλαγής	Στοχευόμενη παραλλαγή (νουκλεοτίδιο)	Στοχευόμενη παραλλαγή (αμινοξύ)	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)
	Διαγραφή	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Προσθήκη	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Υψηλό	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Υψηλό	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Υψηλό	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)
	Διαγραφή	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Προσθήκη	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Χαμηλό	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Χαμηλό	Όλες οι μικρές παραλλαγές DNA Χαμηλό	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Όλες οι παρατηρήσεις που συγκεντρώθηκαν από συνδυασμούς παραλλαγών μελών του πάνελ, για τα οποία η πλειοψηφική αντιστοίχιση είναι αρνητική, δηλ. στοχευόμενες παραλλαγές που φιλοξενούν συντξείς με λιγότερο από 50% θετικών αντιστοιχίσεων.

² Αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου βαθμολογίας Wilson.

Ο Πίνακας 55 παραθέτει την ανάλυση στοιχείων διακύμανσης των συχνοτήτων αλληλόμορφων παραλλαγών (VAF) για περίπου 36 παρατηρήσεις για κάθε μέλος του πάνελ. Η τυπική απόκλιση (SD) και ο ποσοστιαίος συντελεστής διακύμανσης (%CV, συνολικός και για κάθε πηγή) υπολογίστηκαν και παρουσιάστηκαν για κάθε μικρή παραλλαγή DNA στοχευόμενου RET.

Πίνακας 55 Ανάλυση στοιχείων διακύμανσης του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) του VAF σε στοχευόμενα μέλη του πάνελ μικρών παραλλαγών DNA

Επίπεδο παραλλαγής	Τύπος παραλλαγής	Στοχευόμενη παραλλαγή (νουκλεοτίδιο)	Στοχευόμενη παραλλαγή (Αμινοξύ)	N	Μέση VAF	SD κέντρου (%CV)	SD χειριστή (%CV)	SD ημέρας (%CV)	SD αντιγράφων (%CV)	Συνολική 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)
	Διαγραφή	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)
	Προσθήκη	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)
	Διαγραφή	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)
	Προσθήκη	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)

Συντήξεις NTRK 1 – 3 και RET

Για τα μέλη του πάνελ σύντηξης RNA υψηλού επιπέδου, το συνολικό PPC ήταν 99,3% (285/287, 95% CI: 97,5% έως 99,8%) (Πίνακα 56). Το PPC ήταν 100% για κάθε μέλος του πάνελ υψηλού επιπέδου εκτός από το μέλος του πάνελ BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36, 95% CI: 81,9% έως 98,5%]). Το συνολικό PNC για τα μέλη της ομάδας σύντηξης RNA υψηλού επιπέδου ήταν 100,0% (1724/1724, 95% CI: 99,8% έως 100,0%) (Πίνακα 57). Για τα μέλη του στοχευόμενου πάνελ σύντηξης RNA χαμηλού επιπέδου, το συνολικό PPC ήταν 95,4% (272/285, 95% CI: 92,3%, 97,3%) και το συνολικό PNC ήταν 100,0% (1851/1851, 95% CI: 99,8% έως 100,0%).

Πίνακα 56 PPC του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση συντήξεων NTRK και RET σε στοχευόμενα μέλη του πάνελ υψηλού και χαμηλού επιπέδου

Επίπεδο παραλλαγής	Στοχευόμενη σύντηξη	N	Μέσες υποστηρικτικές αναγνίσεις	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)
	Όλες οι συντήξεις Υψηλό	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)
	Όλες οι συντήξεις Χαμηλό	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* Αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης (CI) 95% που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου βαθμολογίας Wilson.

Πίνακα 57 PNC του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση συντήξεων NTRK και RET σε μη στοχευόμενα μέλη του πάνελ υψηλού και χαμηλού επιπέδου

Επίπεδο παραλλαγής	Στοχευόμενες συντήξεις	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)
	Όλες οι συντήξεις - Υψηλό	1724	100,0 (1724/1724)	(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)
	Όλες οι συντήξεις - Χαμηλό	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Όλες οι παρατηρήσεις που συγκεντρώθηκαν από συνδυασμούς παραλλαγών μελών του πάνελ, για τα οποία η πλειοψηφική αντιστοίχιση είναι αρνητική, δηλ. στοχευόμενες παραλλαγές που φιλοξενούν συντήξεις με λιγότερο από 50% θετικών αντιστοιχίσεων.

² Αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης (CI) 95% που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου βαθμολογίας Wilson.

Ο Πίνακας 58 παραθέτει την ανάλυση των στοιχείων διακύμανσης των υποστηρικτικών αναγνώσεων για τις περίπου 36 παρατηρήσεις εντός κάθε στοχευόμενης σύντηξης. Υπολογίστηκαν και παρουσιάστηκαν οι τιμές SD και %CV (συνολικές και για κάθε πηγή) για κάθε στοχευόμενη σύντηξη.

Πίνακας 58 TSO Comprehensive (EU) Ανάλυση των υποστηρικτικών αναγνώσεων στοιχείων διακύμανσης προσδιορισμού σε στοχευόμενα μέλη του πάνελ σύντηξης RNA

Επίπεδο παραλλαγής	Σύντηξη	N	Μέσες υποστηρικτικές αναγνώσεις	SD κέντρου (%CV)	SD χειριστή (%CV)	SD ημέρας (%CV)	SD αντιγράφων (%CV)	Συνολική 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)

Μελέτη 2

Πραγματοποιήθηκε μια δεύτερη μελέτη για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) σε 3 κέντρα εξέτασης (2 εξωτερικά και 1 εσωτερικό), 2 χειριστές/όργανα ανά κέντρο, 3 μοναδικές παρτίδες αντιδραστηρίων, 4 ημέρες εξέτασης (μη διαδοχικές) και 2 εκτελέσεις αλληλούχισης ανά βιβλιοθήκη δειγμάτων.

Η εξέταση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εκχυλισμένων δειγμάτων DNA και RNA από 41 δείγματα ιστού FFPE και 1 κυτταρική σειρά FFPE (με 1 δείγμα ιστού FFPE και την κυτταρική σειρά FFPE που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία 2 μελών πάνελ το καθένα). Τα δείγματα ιστού αποτελούνταν από τους ακόλουθους τύπους: ουροδόχος κύστη, οστό, εγκέφαλος, μαστός, κόλον, νήστιδα, νεφρός, ήπαρ, πνεύμονας, ωοθήκη, προστάτης, δέρμα, μαλακά μόρια, στομάχι, θυρεοειδής και μήτρα. Εξετάστηκαν συνολικά 44 μέλη του πάνελ, συμπεριλαμβανομένων των μελών του πάνελ DNA με μικρές παραλλαγές DNA (SNV, MNV, προσθήκες και διαγραφές), γονιδιακές ενισχύσεις, διαφορετικές βαθμολογίες TMB, υψηλές βαθμολογίες MSI και μέλη του πάνελ RNA με συντήξεις και παραλλαγές ματίσματος. Τα περισσότερα μέλη του πάνελ είχαν γνωστές στοχευόμενες παραλλαγές σε επίπεδα περίπου 2 έως 3 φορές το ειδικό για τις παραλλαγές όριο ανίχνευσης (~2-3xLoD).

Το LoD είναι η συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου στοιχείου όπου τα αποτελέσματα του προσδιορισμού που παρατηρήθηκαν είναι θετικά (ανιχνεύτηκε διακύμανση σε σχέση με την τιμή αποκοπής του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU)) $\geq 95\%$ του χρόνου. Τα μέσα παρατηρούμενα επίπεδα παραλλαγής κατηγοριοποιήθηκαν ως περίπου $< 2 \times \text{LoD}$ (παρατηρούμενα επίπεδα παραλλαγής σε $< 1,5 \times \text{LoD}$), $\sim 2-3 \times \text{LoD}$ (παρατηρούμενα επίπεδα παραλλαγής σε $1,5 \times \text{LoD}$ έως $3,4 \times \text{LoD}$) και περίπου $> 3 \times \text{LoD}$ (παρατηρούμενα επίπεδα παραλλαγής σε $> 3,4 \times \text{LoD}$).

Το PPC για μικρές παραλλαγές DNA, γονιδιακές ενισχύσεις, MSI-υψηλό και παραλλαγές RNA υπολογίστηκαν με συνδυασμό παρατηρήσεων σε όλες τις εκτελέσεις αλληλούχησης και όλα τα κέντρα. Το PNC υπολογίστηκε ομοίως για μικρές παραλλαγές DNA, γονιδιακές ενισχύσεις και παραλλαγές RNA. Για κάθε γνωστή στοχευόμενη παραλλαγή, οι παρατηρήσεις του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) στα μέλη του πάνελ του ίδιου τύπου παραλλαγής αλλά που περιείχαν άλλες παραλλαγές, που δεν προήλθαν από το δείγμα ίδιας προέλευσης, ούτε πληρούσαν τον κανόνα της πλειοψηφίας για τη συγκεκριμένη παραλλαγή ($< 50\%$ των αντιστοιχίσεων ήταν θετικές) συνδυάστηκαν σε όλα τα κέντρα, χειριστές/όργανα, ημέρες, παρτίδες αντιδραστηρίων και εκτελέσεις αλληλούχησης για τον υπολογισμό του PNC. Τα αμφίπλευρα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) 95% υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο βαθμολογίας Wilson.

Μικρές παραλλαγές DNA

Ο Πίνακας 59 παραθέτει τα PPC για στοχευόμενες μικρές παραλλαγές DNA. Τα PPC κυμάνθηκαν από $91,3\%$ για μια μετάλλαξη BRAF SNV έως 100% για την πλειοψηφία των μικρών παραλλαγών DNA.

Πίνακας 59 PPC του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση μικρών παραλλαγών DNA σε συνδυασμένα στοχευόμενα μέλη των πάνελ

Παρατηρούμενο επίπεδο παραλλαγής ¹	Τύπος παραλλαγής	Στοχευόμενη παραλλαγή (νουκλεοτίδιο)	Στοχευόμενη παραλλαγή (αμινοξύ)	Μέση VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	ΠΡΟΣΘΗΚΗ	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	ΠΡΟΣΘΗΚΗ	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
$< 2 \times \text{LoD}$	ΠΡΟΣΘΗΚΗ	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)

Παρατηρούμενο επίπεδο παραλλαγής ¹	Τύπος παραλλαγής	Στοχευόμενη παραλλαγή (νουκλεοτίδιο)	Στοχευόμενη παραλλαγή (αμινοξύ)	Μέση VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
~2-3x LoD	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	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	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	ΠΡΟΣΘΗΚΗ	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	ΠΡΟΣΘΗΚΗ	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	ΠΡΟΣΘΗΚΗ	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	ΠΡΟΣΘΗΚΗ	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Επίπεδο παραλλαγής που υπολογίζεται από τη μέση παρατηρούμενη συχνότητα αλληλόμορφων παραλλαγής.

² Μέση συχνότητα αλληλόμορφων παραλλαγής που υπολογίζεται από τα παρατηρούμενα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

³ Αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου βαθμολογίας Wilson.

Τα PNC ήταν 100% σε μικρές παραλλαγές του DNA.

Ο Πίνακας 60 παραθέτει την ανάλυση των συνιστωσών διακύμανσης των αποτελεσμάτων VAF για κάθε πηγή διακύμανσης και για τη συνολική διακύμανση σε όλα τα μέλη του πάνελ με στοχευόμενες μικρές παραλλαγές DNA.

Πίνακας 60 Ανάλυση συνιστωσών διακύμανσης της VAF για στοχευόμενες μικρές παραλλαγές DNA

Στοχευόμενη παραλλαγή (νουκλεοτίδιο)	N	Μέση VAF	SD κέντρου (%CV)	SD χειριστή (Κέντρο) (%CV)	SD ημέρας (Κέντρο, χειριστής) (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD εκτέλεσης (%CV)	Συνολική 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)

Υπήρχαν δύο στοχευόμενες μικρές παραλλαγές DNA για τις οποίες ο αριθμός παρατηρήσεων ήταν πολύ μικρός για να αντιστοιχιστεί ένα μοντέλο συνιστωσών διακύμανσης. Για αυτές τις δύο στοχευόμενες παραλλαγές, οι συνολικές SD ήταν 0,027 για την παραλλαγή chr1_27024001_C_CG και 0,001 για την παραλλαγή chr17_7578470_C_CGGCGG.

Γονιδιακές ενισχύσεις

Ο Πίνακας 61 παραθέτει τα PPC για στοχευόμενες γονιδιακές ενισχύσεις. Τα PPC ήταν 100,0% για MET και 100,0% για ERBB2.

Πίνακας 61 PPC του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση γονιδιακών ενισχύσεων σε συνδυασμένα στοχευόμενα μέλη του πάνελ

Παρατηρούμενο επίπεδο παραλλαγής ¹	Στοχευόμενη παραλλαγή	Μέση παρατηρούμενη Fold-change ²	Ποσοστό θετικών αντιστοιχίσεων (%)	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 Το επίπεδο διακύμανσης υπολογίστηκε από τη μέση παρατηρούμενη fold-change.

² Μέση fold-change που υπολογίζεται από τα παρατηρούμενα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

³ Αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου βαθμολογίας Wilson.

Τα PNC ήταν 100% σε όλες τις γονιδιακές ενισχύσεις.

Ο Πίνακας 62 παραθέτει την ανάλυση συνιστωσών διακύμανσης των αποτελεσμάτων του fold-change για κάθε πηγή διακύμανσης και συνολικής διακύμανσης σε όλα τα μέλη της ομάδας με στοχευόμενες γονιδιακές ενισχύσεις.

Πίνακας 62 Ανάλυση συνιστωσών διακύμανσης του Fold-Change για στοχευόμενες γονιδιακές ενισχύσεις

Στοχευόμενη παραλλαγή	N	Μέση fold-change	SD κέντρου (%CV)	SD χειριστή (Κέντρο) (%CV)	SD ημέρας (Κέντρο, χειριστής) (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD εκτέλεσης (%CV)	Συνολική 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

Ο Πίνακας 63 παραθέτει τα PPC για στοχευόμενα μέλη του πάνελ MSI-High. Το PPC ήταν 100% και για τα δύο μέλη του πάνελ MSI-High.

Πίνακας 63 PPC του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση κατάστασης MSI-H σε συνδυασμένα στοχευόμενα μέλη του πάνελ

Μέλος πάνελ	Μέση βαθμολογία MSI ¹	N	Ποσοστό θετικών αντιστοιχίσεων (%)	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)
Όλα τα μέλη		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Η μέση παρατηρούμενη βαθμολογία MSI υπολογίστηκε από τα παρατηρούμενα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

² Αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου βαθμολογίας Wilson.

Ο Πίνακας 64 παραθέτει την ανάλυση των συνιστωσών διακύμανσης των αποτελεσμάτων της βαθμολογίας MSI για κάθε πηγή διακύμανσης και για τη συνολική διακύμανση σε όλα τα στοχευόμενα μέλη του πάνελ για την κατάσταση MSI-High.

Πίνακας 64 Ανάλυση συνιστωσών διακύμανσης της βαθμολογίας MSI για στοχευόμενα μέλη του πάνελ MSI-High

Μέλος πάνελ	N	Μέση βαθμολογία MSI	SD κέντρου (%CV)	SD χειριστή (Κέντρο) (%CV)	SD ημέρας (Κέντρο, χειριστής) (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD εκτέλεσης (%CV)	Συνολική 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

Για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας των βαθμολογιών TMB, πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση της βαθμολογίας σε στοχευόμενα μέλη του πάνελ TMB, τα οποία αντιπροσώπευαν ένα εύρος αναμενόμενων βαθμολογιών TMB. Ο Πίνακας 65 παραθέτει την ανάλυση των συνιστωσών διακύμανσης των αποτελεσμάτων της βαθμολογίας TMB για κάθε πηγή διακύμανσης και για τη συνολική διακύμανση στα μέλη του πάνελ TMB. Οι συνολικές SD της βαθμολογίας TMB ήταν 1,0 (%CV = 13) για ένα μέλος του πάνελ (μέση βαθμολογία TMB = 7,6) και 1,1 (%CV = 2) για ένα άλλο μέλος του πάνελ (μέση βαθμολογία TMB = 63,2).

Πίνακα 65 Ανάλυση συνιστωσών διακύμανσης της βαθμολογίας TMB για στοχευόμενα μέλη του πάνελ TMB

Μέλος πάνελ*	N	Μέση βαθμολογία TMB	SD κέντρου (%CV)	SD χειριστή (Κέντρο) (%CV)	SD ημέρας (Κέντρο, χειριστής) (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD εκτέλεσης (%CV)	Συνολική 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)

* Υπήρχε 1 μέλος της ομάδας TMB για το οποίο ο αριθμός παρατηρήσεων ήταν πολύ μικρός (N = 2) για να αντιστοιχιστεί ένα μοντέλο συνιστωσών διακύμανσης. Για αυτό το μέλος του πάνελ, η συνολική SD ήταν 1,7.

Παραλλαγές RNA

Ο Πίνακα 66 παραθέτει τα PPC για στοχευόμενες παραλλαγές RNA. Τα PPC κυμάνθηκαν από 91,7% για την KIF5B-RET έως 100% για τις περισσότερες παραλλαγές RNA.

Πίνακα 66 PPC του TSO Comprehensive (EU) προσδιορισμού για την ανίχνευση παραλλαγών RNA σε συνδυασμένα στοχευόμενα μέλη του πάνελ

Παρατηρούμενο επίπεδο παραλλαγής ¹	Τύπος παραλλαγής	Στοχευόμενη παραλλαγή	Μέσες υποστηρικτικές αναγνώσεις ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
> 3x LoD	Σύντηξη	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Σύντηξη	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Σύντηξη	CD74-ROS1,GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Σύντηξη	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Σύντηξη	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Σύντηξη	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Σύντηξη	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	Σύντηξη	DHX8,ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Σύντηξη	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Σύντηξη	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Σύντηξη	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Σύντηξη	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Σύντηξη	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Σύντηξη	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	Σύντηξη	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
	Σύντηξη	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
> 3x LoD	Σύντηξη	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Παραλλαγή ματίσματος	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	Παραλλαγή ματίσματος	Παράλειψη εξονίου 14 MET	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Επίπεδο παραλλαγής που υπολογίζεται από τις μέσες παρατηρούμενες υποστηρικτικές αναγνώσεις.

² Μέσες υποστηρικτικές αναγνώσεις που υπολογίζονται από τα παρατηρούμενα αποτελέσματα του προσδιορισμού.

³ Αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου βαθμολογίας Wilson.

Το PNC ήταν 100% για κάθε στοχευόμενη παραλλαγή RNA, εκτός από τη σύντηξη FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60% (984/988, 95% CI: 98,96% έως 99,84%).

Ο Πίνακας 67 παραθέτει την ανάλυση των συνιστωσών διακύμανσης των αποτελεσμάτων υποστηρικτικών αναγνώσεων για κάθε πηγή διακύμανσης και για τη συνολική διακύμανση σε όλα τα μέλη του πάνελ με στοχευόμενες παραλλαγές RNA.

Πίνακας 67 Ανάλυση συνιστωσών διακύμανσης των υποστηρικτικών αναγνώσεων για στοχευόμενες παραλλαγές RNA

Στοχευόμενη παραλλαγή	N	Μέσες υποστηρικτικές αναγνώσεις	SD κέντρου (%CV)	SD χειριστή (Κέντρο) (%CV)	SD ημέρας (Κέντρο, χειριστής) (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD εκτέλεσης (%CV)	Συνολική SD (%CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1,GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8,ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
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)
Παραλλαγή ματίσματος EGFR vIII	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Παραλλαγή ματίσματος παράλειψης εξονίου 14 MET	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Ενδοεργαστηριακή ακρίβεια

Διεξήχθησαν δύο μελέτες για την αξιολόγηση της ενδοεργαστηριακής ακρίβειας για το TSO Comprehensive (EU). Η Μελέτη 1 αξιολόγησε τις συντήξεις NTRK και RET και τις μικρές παραλλαγές του DNA στο RET. Η Μελέτη 2 αξιολόγησε τα TMB και MSI.

Μελέτη 1

Η ενδοεργαστηριακή ακρίβεια αξιολογήθηκε για συντήξεις NTRK1 – 3 (γλοίωμα χαμηλότερου βαθμού, πολύμορφο γλοιοβλάστωμα, μυοϊνοβλαστικό σάρκωμα, εκκριντικός καρκίνος του μαστού), συντήξεις RET (καρκίνος του θυρεοειδούς και δερματικός ιστός από άγνωστο καρκίνο) και μικρές παραλλαγές DNA του RET (μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς) με ιστούς FFPE από τους ενδεδειγμένους καρκίνους. Κάθε δείγμα εξετάστηκε σε δύο επίπεδα παραλλαγής: ~1x LoD (χαμηλό επίπεδο παραλλαγής) και ~2 – 3x LoD (υψηλό επίπεδο παραλλαγής), εκτός από το δείγμα που φέρει CCDC6-RET, το οποίο εξετάστηκε μόνο στο χαμηλό επίπεδο παραλλαγής. Καθένα από τα δείγματα σε κάθε επίπεδο εξέτασης αναλύθηκε εις διπλούν σε κάθε διαδικασία προετοιμασίας βιβλιοθήκης από τρεις (3) χειριστές. Κάθε χειριστής ξεκίνησε την προετοιμασία της βιβλιοθήκης σε τρεις (3) μη διαδοχικές ημέρες έναρξης και την υπέβαλε σε αλληλούχιση με τη χρήση τριών (3) καθορισμένων οργάνων NextSeq 550Dx. Εξετάστηκαν τρεις (3) παρτίδες αντιδραστηρίων που παρήγαγαν 54 παρατηρήσεις ανά επίπεδο. Ορισμένα επίπεδα είχαν λιγότερες από 54 παρατηρήσεις λόγω μη έγκυρων βιβλιοθηκών.

Ποιοτική ανάλυση

Η ποιοτική συμφωνία της αντιστοίχισης παραλλαγών αξιολογήθηκε ξεχωριστά για τα δύο επίπεδα παραλλαγών για μια δεδομένη παραλλαγή από συγκεντρωτικές παρατηρήσεις σε όλες τις μεταβλητές (χειριστές, παρτίδες αντιδραστηρίων, όργανα, ημέρες και αντίγραφα). Οι PPC και οι PNC και το σχετιζόμενο αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% (βαθμολογία Wilson) συνοψίζονται στον [Πίνακα 68](#) (μικρές παραλλαγές DNA) και στον [Πίνακα 69](#) (συντήξεις RNA).

Στο υψηλό επίπεδο παραλλαγής (~2 – 3x LoD), ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) κατέδειξε 100% για PPC και PNC για όλες τις παραλλαγές που εξετάστηκαν.

Στο χαμηλό επίπεδο παραλλαγής (~1x LoD), το PPC για μικρές παραλλαγές DNA κυμαινόταν από 83,3% έως 98,1% και το PPC για συντήξεις RNA κυμαινόταν από 90,7% έως 100%. Για παραλλαγές με PPC <95%, οι μέσες τιμές VAF (RET C634Y και RET D898_E901del) ή οι υποστηρικτικές αναγνώσεις (NCOA4-RET και BCAN-NTRK1) ήταν κάτω από τα αντίστοιχα όρια ανίχνευσης. Στο χαμηλό επίπεδο παραλλαγής, επιτεύχθηκε 100% PNC για όλες τις παραλλαγές.

Πίνακα 68 Ποιοτικά αποτελέσματα για τις στοχευόμενες παραλλαγές DNA

Επίπεδο παραλλαγής	Παραλλαγή	Τύπος παραλλαγής	Μέση 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	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	0,048	87,0 (47/54) (75,6, 93,6)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET C618R	SNV	0,045	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET M918T	SNV	0,042	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	100,0 (216/216) (98,3, 100,0)
	RET D631_ L633delinsE*	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
~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	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	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*	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Οι αλλαγές νουκλεοτιδίων παρατίθενται για κάθε παραλλαγή στην ενότητα Όριο ανίχνευσης εκτός από το RET D631_
L633delinsE, το οποίο είναι το Χρωμόσωμα 10, Θέση 43609940, ACGAGCT αναφοράς, Εναλλακτική A.

Πίνακα 69 Ποιοτικά αποτελέσματα για τις στοχευόμενες συντήξεις RNA

Επίπεδο παραλλαγής	Σύντηξη	Μέσες υποστηρικτικές αναγνώσεις	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 (κυτταρική σειρά 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 (δείγμα 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (δείγμα 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Επίπεδο παραλλαγής	Σύντηξη	Μέσες υποστηρικτικές αναγνώσεις	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 (κυτταρική σειρά 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	Δ/Ι	Δεν εξετάστηκε	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (δείγμα 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (δείγμα 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Ποσοτική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση στοιχείων περιορισμένης μέγιστης πιθανοφάνειας (REML) για την αξιολόγηση της συνολικής διακύμανσης της υποκείμενης συνεχούς μεταβλητής (VAF για μικρές παραλλαγές DNA και υποστηρικτικές αναγνώσεις για συντήσεις RNA) και την εκτίμηση των στοιχείων ακρίβειας [τυπική απόκλιση (SD), συντελεστής διακύμανσης (CV)] για κάθε πηγή διακύμανσης [χειριστές, όργανα, ημέρες, παρτίδες αντιδραστηρίων, υπολειπόμενο και συνολικό]. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον [Πίνακα 70](#) για μικρές παραλλαγές DNA και στον [Πίνακα 71](#) για συντήσεις RNA.

Η διακύμανση στην VAF αυξήθηκε με τη μέση τιμή όπως αναμενόταν για διωνυμική αναλογία. Η διακύμανση στις υποστηρικτικές αναγνώσεις αυξήθηκε με τη μέση τιμή όπως αναμενόταν με τα δεδομένα μέτρησης. Το υπολειμματικό στοιχείο ήταν ο μεγαλύτερος παράγοντας που συνέβαλε στη συνολική διακύμανση τόσο των

μικρών παραλλαγών DNA όσο και των συντήξεων RNA και στα δύο επίπεδα, υποστηρίζοντας το συμπέρασμα ότι η ανίχνευση αυτών των παραλλαγών με το TSO Comprehensive (EU) είναι ισχυρή για τους χειριστές, τις παρτίδες, τα όργανα και τις ημέρες.

Πίνακα 70 Ποσοτικά αποτελέσματα SD και CV για στοχευόμενες μικρές παραλλαγές DNA

Επίπεδο VAF	Παραλλαγή	Τύπος παραλλαγής	N Έγκυρες προσπάθειες	Μέση VAF	SD χειριστή (%CV)	SD οργάνου (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD ημέρας (%CV)	Υπολειπόμενη SD (%CV)	Συνολική SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	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	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	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	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	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	ΔΙΑΓΡΑΦΗ	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)

Πίνακα 71 Ποσοτικά αποτελέσματα SD και CV για τις στοχευόμενες συντήξεις RNA

Επίπεδο υποστηρικτικών αναγνώσεων	Σύντηξη	N Έγκυρες προσπάθειες	Μέσες υποστηρικτικές αναγνώσεις	SD χειριστή (%CV)	SD οργάνου (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD ημέρας (%CV)	Υπολειπόμενη SD (%CV)	Συνολική 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 (κυτταρική σειρά)	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 (Δείγμα 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (Δείγμα 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 (κυτταρική σειρά)	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 (Δείγμα 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (Δείγμα 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Μελέτη 2

Η ενδοεργαστηριακή ακρίβεια αξιολογήθηκε για TMB και MSI. Χρησιμοποιήθηκαν πέντε δείγματα DNA FFPE NSCLC για TMB και επτά δείγματα FFPE CRC για MSI, συμπεριλαμβανομένων τόσο των δειγμάτων σταθερότητας MS όσο και των δειγμάτων υψηλής MSI, για την αξιολόγηση της ακρίβειας σε διαφορετικά

επίπεδα σε όλο το εύρος των βαθμολογιών. Καθένα από τα δείγματα αναλύθηκε εις διπλούν από τρεις (3) χειριστές, σε τρεις (3) ημέρες, με τρεις (3) προετοιμασίες βιβλιοθήκης για τρεις (3) παρτίδες αντιδραστηρίων χρησιμοποιώντας τρία όργανα NextSeq 550Dx που παρήγαγαν 54 παρατηρήσεις ανά επίπεδο.

Αξιολογήθηκε η ποιοτική συμφωνία για την κατάσταση MSI. Ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) κατέδειξε 100% συμφωνία για ποσοστιαίες θετικές αντιστοιχίσεις και ποσοστιαίες αρνητικές αντιστοιχίσεις για την κατάσταση MSI. Για το TMB, ο προσδιορισμός TSO Comprehensive (EU) αναφέρει μια βαθμολογία TMB. Η ποιοτική συμφωνία δεν έχει εφαρμογή.

Η συνολική διακύμανση των βαθμολογιών TMB και MSI, μαζί με τη συνεισφορά ανά πηγή (όργανα, χειριστές, παρτίδες, ημέρες και υπόλειμμα), ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο στοιχείων διακύμανσης σε ένα εύρος βαθμολογιών. Η τυπική απόκλιση (SD) και ο συντελεστής διακύμανσης (CV) παρουσιάζονται στον Πίνακα 72 για το TMB και στον Πίνακα 73 για το MSI ανά επίπεδο. Ορισμένα επίπεδα είχαν λιγότερες από 54 παρατηρήσεις λόγω μη έγκυρων βιβλιοθηκών.

Πίνακα 72 Ποσοτικά αποτελέσματα SD και CV βαθμολογίας TMB

Επίπεδο	Μέση βαθμολογία TMB	N Έγκυρες προσπάθειες	SD χειριστή (%CV)	SD οργάνου (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD ημέρας (%CV)	Υπολειπόμενη SD (%CV)	Συνολική 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)

Πίνακα 73 Ποσοτικά αποτελέσματα SD και CV βαθμολογίας MSI

Κατάσταση MSI	Επίπεδο	Μέση βαθμολογία MSI (%)	N Έγκυρες προσπάθειες	SD χειριστή (%CV)	SD οργάνου (%CV)	SD παρτίδας (%CV)	SD ημέρας (%CV)	Υπολειπόμενη SD (%CV)	Συνολική SD (%CV)
MS-σταθερή	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)
Υψηλή MSI	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)

Η διακύμανση των βαθμολογιών TMB τείνει να αυξάνεται με τη μέση τιμή όπως αναμένεται από τις θεωρητικές κατανομές των δεδομένων μέτρησης. Η διακύμανση των βαθμολογιών MSI για επίπεδα κοντά στη βαθμολογία MSI = 50 είναι μεγαλύτερη από τη διακύμανση των βαθμολογιών MSI πλησιέστερα στο 0 ή το 100, σύμφωνα με τη μεταβλητότητα από τις θεωρητικές κατανομές των δεδομένων αναλογίας. Το υπολειμματικό στοιχείο παρέμεινε ο μεγαλύτερος συντελεστής στη συνολική διακύμανση τόσο για τις βαθμολογίες MSI όσο και για τις βαθμολογίες TMB, υποστηρίζοντας το συμπέρασμα ότι οι βαθμολογίες είναι ισχυρές για τους χειριστές, τις παρτίδες, τα όργανα και τις ημέρες. Ωστόσο, τόσο το MSI όσο και το TMB είναι σύνθετοι βιοδείκτες και οι αναλυτικές επιδόσεις μπορεί να διαφέρουν από δείγμα σε δείγμα. Δηλαδή, η διακύμανση του TMB δεν εξαρτάται μόνο από την τιμή του TMB αλλά και από τη σύνθεση παραλλαγών στο δείγμα, όπως ο

τύπος παραλλαγής (SNV, Indel) και το επίπεδο VAF (κοντά στην τιμή αποκοπής ένταξης). Ομοίως, η διακύμανση του MSI εξαρτάται όχι μόνο από την τιμή του MSI αλλά και από τη σύνθεση των θέσεων στο δείγμα, όπως ο αριθμός των τόπων που είναι ασταθείς και το μέγεθος της αστάθειας ανά τόπο.

Οι τιμές C5 και C95 γύρω από την τιμή αποκοπής 20,00% προσδιορίστηκαν για MSI χρησιμοποιώντας ένα προφίλ ακρίβειας (Πίνακα 74).

Πίνακα 74 Διαστήματα C5-C95 για MSI

Βαθμολογία	C5	C95
MSI	17,17%	23,32%

Αξιολογήθηκε η επίδραση του περιεχομένου του όγκου στις βαθμολογίες TMB και MSI. Για τα περισσότερα δείγματα, περιεχόμενο όγκου $\geq 30\%$ είχε αμελητέα επίδραση στις βαθμολογίες TMB πάνω από περίπου 10 μεταλλάξεις ανά μεγαβάση. Οι βαθμολογίες TMB παρέμειναν σχετικά αμετάβλητες με αύξηση του περιεχομένου του όγκου. Για δείγματα με υψηλή βαθμολογία MSI, το περιεχόμενο του όγκου παρουσίασε θετική, γραμμική συσχέτιση με τη βαθμολογία MSI. Τα δείγματα με υψηλή MSI παρέμειναν MSI-H κατά μέσο όρο όταν το περιεχόμενο όγκου ήταν $\geq 30\%$. Τα δείγματα ενδομητρίου συμπεριφέρθηκαν διαφορετικά από τους άλλους τύπους ιστών και διαπιστώθηκε ότι χρειάζονταν μεγαλύτερη ποσότητα περιεχομένου όγκου για να ονομαστούν MSI-High.

Ακρίβεια για τον προσδιορισμό του προφίλ του όγκου

Η ανίχνευση παραλλαγών από τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα των μεθόδων αναφοράς. Οι μικρές παραλλαγές του DNA και το TMB συγκρίθηκαν με μια εξωτερική επικυρωμένη μέθοδο NGS όλων των εξονίων του γονιδιώματος. Οι γονδιακές ενισχύσεις συγκρίθηκαν έναντι της ίδιας μεθόδου NGS όλων των εξονίων του γονιδιώματος ή της επικυρωμένης μεθόδου διπλού in-situ υβριδισμού (DISH) για τις ενισχύσεις HER2. Το MSI αξιολογήθηκε έναντι επικυρωμένης εξέτασης MSI-PCR. Οι παραλλαγές ματίσματος RNA συγκρίθηκαν με μια επικυρωμένη ποσοτική μέθοδο PCR (qPCR). Οι συντήξεις ROS1 και ALK συγκρίθηκαν με επικυρωμένους προσδιορισμούς FISH. Όλες οι άλλες συντήξεις συγκρίθηκαν με μια σύνθετη μέθοδο που περιλάμβανε έναν επικυρωμένο προσδιορισμό NGS όλων των εξονίων του γονιδιώματος RNA (RNGS1), ένα στοχευόμενο πάνελ NGS (RNGS2) και ψηφιακή PCR σταγονιδίων (ddPCR).

Ανίχνευση μικρών παραλλαγών DNA

Η ανίχνευση μικρών παραλλαγών DNA από τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης όλων των εξονίων του γονιδιώματος (WES) που χρησιμοποιεί WES σε συνδυασμό με αντιστοιχισμένα ζεύγη καρκινικών-φυσιολογικών δειγμάτων για αντιστοίχιση μικρών παραλλαγών βλαστικής σειράς και μικρών σωματικών παραλλαγών. Η σύγκριση μεταξύ μικρών παραλλαγών, που αποτελούνταν από παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου (SNV), προσθήκες και διαγραφές, βασίστηκε σε 124 δείγματα από 14 διαφορετικούς τύπους ιστών που ήταν έγκυροι τόσο για το TSO Comprehensive (EU) όσο και για τον WES. Το TSO Comprehensive (EU) αλλά όχι ο προσδιορισμός WES μπορεί να ανιχνεύσει πολυνουκλεοτιδικές παραλλαγές (MNV, 2 – 3 bp) που απαιτούν phasing. TSO Comprehensive

(EU) Οι MNV αξιολογήθηκαν ως μεμονωμένες SNV από τον WES. Μια σύνοψη συμφωνίας στο επίπεδο παραλλαγών, συμπεριλαμβανομένης της θετικής ποσοστιαίας συμφωνίας (PPA) και της αρνητικής ποσοστιαίας συμφωνίας (NPA) για όλες τις αντιστοιχίσεις παραλλαγών, παρατίθεται στον [Πίνακα 75](#).

Πίνακα 75 Σύνοψη συμφωνίας για αντιστοιχίσεις μικρών παραλλαγών που αξιολογήθηκαν βάσει κατάστασης βλαστικής σειράς ή σωματικής κατάστασης

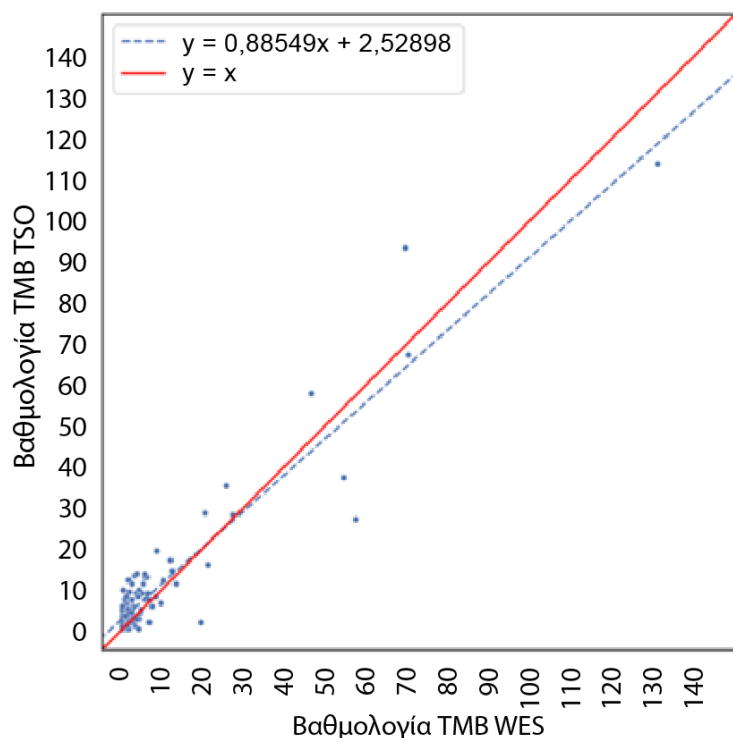
	Σωματική Αντιστοίχιση από WES	Βλαστική σειρά Αντιστοίχιση από WES	Δεν αντιστοιχίστηκε από WES
Αντιστοίχιση από TSO Comprehensive (EU)	382	33163	426
Δεν αντιστοιχίστηκε από TSO Comprehensive (EU)	69	61	70000481
Σύνολο	451	33224	70000907
Ποσοστιαία συμφωνία	PPA: 85% (382/451), 95% CI: [81%, 87%]	PPA: > 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%]

Συνολικά, το TSO Comprehensive (EU) αντιστοίχισε 426 παραλλαγές που δεν ανιχνεύτηκαν στη μέθοδο WES. Διακόσιες τέσσερις (48%) από αυτές τις παραλλαγές είχαν συχνότητες αλληλόμορφων παραλλαγής κάτω από το όριο για αντιστοίχιση στη μέθοδο WES. Από τις υπόλοιπες δυνητικά ψευδώς θετικές παραλλαγές, υπήρχαν στοιχεία για την αντιστοίχιση της παραλλαγής στη μέθοδο WES με χαμηλή υποστήριξη. Επίσης, πολλές από τις παραλλαγές είχαν πολύ χαμηλού επιπέδου στοιχεία WES στα αντιστοιχισμένα φυσιολογικά δείγματα. Αυτό το αποτέλεσμα υποδηλώνει ότι αυτές οι παραλλαγές παραλείφθηκαν στον όγκο από τον WES λόγω όγκου σε φυσιολογική μόλυνση.

Ανίχνευση του φορτίου μεταλλάξεων του όγκου

Η συμφωνία TMB προσδιορίστηκε με τη σύγκριση των βαθμολογιών TMB (σωματικές μεταλλάξεις/μεγαβάση) μεταξύ της μεθόδου WES και του TSO Comprehensive (EU) για 124 δείγματα με διαθέσιμα δεδομένα τόσο από το TSO Comprehensive (EU) όσο και από την WES. Η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης με WES ως προγνωστικός παράγοντας είχε σημείο τομής y 2,53, κλίση 0,89 και συντελεστή συσχέτισης Pearson 0,94 (Εικόνα 3).

Εικόνα 3 Συσχέτιση βαθμολογίας TMB μεταξύ WES και TSO Comprehensive (EU)



Ανίχνευση γονιδιακών ενισχύσεων

Η ανίχνευση γονιδιακών ενισχύσεων από τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα του ίδιου προσδιορισμού WES χρησιμοποιώντας είτε αντιστοιχισμένα καρκινικά-φυσιολογικά δείγματα είτε καρκινικά δείγματα μόνο. Συνολικά, υπήρχαν 420 δείγματα από τα οποία 183 χρησιμοποίησαν την ορθογώνια μέθοδο καρκινικών-φυσιολογικών και 237 χρησιμοποίησαν τη μέθοδο καρκινικών μόνο. Από τα 420 δείγματα, επιλέχθηκαν 50 δείγματα για τη μελέτη επειδή ήταν θετικά στην ενίσχυση με προσδιορισμό προκατόχου TSO Comprehensive (EU) ή με προσδιορισμό προκατόχου. Η απόδοση για αυτά τα χαρακτηρισμένα δείγματα προσαρμόστηκε με τη χρήση ενός μέσου επιπολασμού σύντηξης. Η συνδυασμένη απόδοση σε χαρακτηρισμένα και μη χαρακτηρισμένα δείγματα χρησιμοποίησε σταθμισμένο μέσο όρο αντίστροφης διακύμανσης. Τα δείγματα προέρχονταν από 14 τύπους ιστών και περιείχαν ενισχύσεις από 55

γονίδια. Το TSO Comprehensive (EU) αναφέρει γονιδιακές ενισχύσεις από τα γονίδια MET και ERBB2. Ωστόσο, η ακρίβεια αξιολογήθηκε και για τα 55 γονίδια. Μια σύνοψη των αντιστοιχίσεων γονιδιακών ενισχύσεων παρατίθεται στον [Πίνακα 76](#).

Πίνακα 76 Σύνοψη συμφωνίας για γονιδιακές ενισχύσεις

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

* Διάστημα εμπιστοσύνης υπολογισμένο από το bootstrap.

Οι ενισχύσεις του ERBB2 (HER2) σε γαστρικούς και μαστικούς ιστούς αναλύθηκαν ξεχωριστά από άλλες γονιδιακές ενισχύσεις με τη χρήση μιας μεθόδου διπλού in-situ υβριδισμού (DISH). Συνολικά, εξετάστηκαν 116 δείγματα μαστικού και γαστρικού ιστού, εκ των οποίων τα 64 είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί ως θετικά για HER2 με τη μέθοδο IHC ή FISH. Ένα δείγμα δεν ήταν έγκυρο για εκχύλιση, 4 δείγματα δεν ήταν έγκυρα για το TSO Comprehensive (EU) και 3 δείγματα δεν ήταν έγκυρα για τον προσδιορισμό DISH. Από τα 108 δείγματα, 20 (18,5%) είχαν οριακές βαθμολογίες (μεταξύ 1,5 και 2,5) κοντά στην τιμή αποκοπής 2,0 DISH. Τα αποτελέσματα συμφωνίας συμπεριλαμβανομένων των PPA, NPA για όλα τα δείγματα και εξαιρουμένων των οριακών περιπτώσεων HER2 DISH παρατίθενται στον [Πίνακα 77](#).

Πίνακα 77 Σύνοψη συμφωνίας μεταξύ του TSO Comprehensive και του HER2 DISH, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής ενίσχυσης HER2

Γονιδιακή ενίσχυση HER2 Όλα (Μαστού και στομάχου)	Ενίσχυση HER2 με DISH	Χωρίς ενίσχυση HER2 με DISH
Θετικό με TSO Comprehensive (EU)	17 (συμπεριλαμβάνεται 1 οριακό)	13 (συμπεριλαμβάνεται 1 οριακό)
Αρνητικό με TSO Comprehensive (EU)	10 (συμπεριλαμβάνονται 6 οριακά)	68 (συμπεριλαμβάνονται 12 οριακά)
Ποσοστιαία συμφωνία, συμπεριλαμβανομένων οριακών περιπτώσεων	PPA: 63% (17/27) 95% CI: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95% CI: [74%, 90%]
Ποσοστιαία συμφωνία εξαιρουμένων οριακών περιπτώσεων	PPA: 80% (16/20) 95% CI: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95% CI: [72%, 90%]

Ανίχνευση μικροδορυφορικής αστάθειας

Η ανίχνευση μικροδορυφορικής αστάθειας από τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) συγκρίθηκε με τα αποτελέσματα μιας επικυρωμένης εξέτασης MSI-PCR που χρησιμοποιεί αντιστοιχισμένα φυσιολογικά-καρκινικά δείγματα για εξέταση. Συγκρίθηκαν συνολικά 195 δείγματα, τα οποία πληρούσαν την απαίτηση για περιεχόμενο όγκου $\geq 30\%$ (για κατάσταση MS-σταθερά) και αντιπροσώπευαν 14 τύπους ιστών. Η MSI-PCR αξιολογεί 5 τόπους και έχει 3 αποτελέσματα — MSI-Σταθερή (χωρίς ασταθείς θέσεις), MSI-Χαμηλή (ένας ασταθής τόπος) και MSI-Υψηλή (MSI-H) (δύο ή περισσότεροι ασταθείς τόποι). Το TSO Comprehensive (EU)

αξιολογεί έως 130 μικροδορυφορικούς τόπους και ταξινομεί τα δείγματα μόνο ως MS-Σταθερή ή MSI-Υψηλή ($\geq 20\%$ ασταθείς τόποι). Τα αποτελέσματα MSI-Χαμηλής ομαδοποιήθηκαν με εκβάσεις MS-Σταθερή για την MSI-PCR. Η ανάλυση συμφωνίας παρατίθεται στον [Πίνακα 78](#).

Πίνακα 78 Σύνοψη ανάλυσης συμφωνίας μεταξύ του TSO Comprehensive (EU) και της MSI-PCR για μικροδορυφορική αστάθεια DNA

Κατάσταση MSI	PCR MSI-Υψηλή	PCR MSI-Χαμηλή	PCR MSI-Σταθερή
Ασταθής TSO Comprehensive (EU) (MSI-Υψηλή)	41	2	0
Σταθερή TSO Comprehensive (EU) (MS-Σταθερή)	3	0	150
Σύνολο	44	2	150
Ποσοστιαία συμφωνία	PPA: 93% (41/44) 95% CI: [82%, 98%]	NPA: 99% (150/152) 95% CI: [95%, >99%]	

Ανίχνευση παραλλαγών ματίσματος RNA

Η ακρίβεια για την ανίχνευση παραλλαγών ματίσματος υπολογίστηκε με σύγκριση των αποτελεσμάτων TSO Comprehensive (EU) με τους προσδιορισμούς qPCR για EGFRvIII και παράλειψης MET exon 14, συμπεριλαμβανομένου ενός γνωστού θετικού RNA για καθεμία από τις παραλλαγές ματίσματος. Διεξήχθη ανάλυση συμφωνίας σε συνολικά 230 μοναδικά δείγματα RNA FFPE από 14 τύπους ιστών με διαθέσιμα δεδομένα τόσο με το TSO Comprehensive (EU) όσο και με τη μέθοδο αναφοράς. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν για παράλειψη MET exon 14, ενώ το EGFRvIII εξετάστηκε μόνο σε εγκεφαλικό ιστό, αντίστοιχα. Τρία δείγματα που αντιστοιχίστηκαν ως θετικά για παράλειψη MET εξονίου 14 από τον qPCR, αλλά όχι από το TSO Comprehensive (EU) είχαν μέση Ct >37 και ήταν κάτω από το επίπεδο LoD του TSO Comprehensive (EU). Ο [Πίνακα 79](#) συνοψίζει τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνίας.

Πίνακα 79 Σύνοψη ανάλυσης συμφωνίας μεταξύ του TSO Comprehensive (EU) και του προσδιορισμού qPCR για παραλλαγές ματίσματος RNA

Παραλλαγές ματίσματος RNA	Θετική με qPCR	Αρνητική με qPCR
Θετικό με TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	3	0
Αρνητικό με TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	0	13
Θετικό με TSO Comprehensive (EU) (Παράλειψη MET εξονίου 14)	1	0
Αρνητικό με TSO Comprehensive (EU) (Παράλειψη MET εξονίου 14)	3	217
Σύνολο	7	230

Παραλλαγές ματίσματος RNA	Θετική με qPCR	Αρνητική με qPCR
Ποσοστιαία συμφωνία	PPA: 57% (4/7) 95% CI: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95% CI: [98%, 100%]

Ανίχνευση συντήξε ι ν RNA

Σύγκριση με σύνθετη μέθοδο

Οι συντήξεις TSO Comprehensive (EU) συγκρίθηκαν με μια σύνθετη μέθοδο που περιλάμβανε αλληλούχηση ολόκληρου του εξονιώματος RNA με τη χρήση ενός πάνελ NGS (RNGS1), ενός πάνελ στοχευόμενης σύντηξης NGS (RNGS2) και ψηφιακής PCR σταγονιδίων (ddPCR).

Η μέθοδος RNGS1 συμπίπτει με όλα τα γονίδια για τα οποία το TSO Comprehensive (EU) μπορεί να ανιχνεύσει συντήξεις. Ωστόσο, το όριο ανίχνευσης της μεθόδου RNGS1 ήταν 4X – 8X του ορίου ανίχνευσης του TSO Comprehensive (EU) με βάση τον αριθμό των υποστηρικτικών αναγνώσεων που παρατηρήθηκαν στις αντιστοιχίσεις συντήξεων που συνέπιπταν. Ως εκ τούτου, με τη μέθοδο WES (RNGS1) χρησιμοποιήθηκε μια σύνθετη μέθοδος που χρησιμοποιούσε δύο πρόσθετες μεθόδους με μεγαλύτερη ευαισθησία, αλλά μικρότερο εύρος συντήξεων.

Εξετάστηκαν συνολικά 255 μοναδικά δείγματα RNA που αντιπροσωπεύουν 14 τύπους ιστού και που περνούν τις μετρήσεις του TSO Comprehensive (EU) με τη μέθοδο RNGS1. Δύο δείγματα δεν ήταν έγκυρα για τον ποιοτικό έλεγχο δείγματος RNGS1 και αποκλείστηκαν από την πρόσθετη ανάλυση. Από τις 82 συντήξεις που αντιστοιχίστηκαν από το TSO Comprehensive (EU), οι 4 αποκλείστηκαν από την αξιολόγηση λόγω αποτυχημένων ποιοτικών ελέγχων του δείγματος RNGS1 και 7 πρόσθετες συντήξεις δεν ήταν δυνατόν να αντιστοιχιστούν λόγω απουσίας των στόχων στο πάνελ RNGS1. Από τις υπόλοιπες 71 συντήξεις που αντιστοιχίστηκαν από το TSO Comprehensive (EU), 9 συντήξεις επιβεβαιώθηκαν από την RNGS1. Η RNGS1 αντιστοίχισε 4 συντήξεις που δεν αντιστοιχίστηκαν από το TSO Comprehensive (EU).

Από τις 62 συντήξεις που ήταν θετικές για TSO Comprehensive (EU) και δεν ανιχνεύτηκαν από την RNGS1, 13 συνέπεσαν με το τη μέθοδο RNGS2 και επιβεβαιώθηκαν από αυτήν. Μία σύντηξη αντιστοιχίστηκε από την RNGS2 αλλά δεν αντιστοιχίστηκε από το TSO Comprehensive (EU).

Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ψηφιακή PCR σταγονιδίων για συντήξεις που αντιστοιχίστηκαν από το TSO Comprehensive (EU), που δεν αντιστοιχίστηκαν ή δεν μπορούν να αντιστοιχιστούν από την RNGS1 και δεν μπορούν να αξιολογηθούν από την RNGS2 (49). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε ddPCR για την επαναξιολόγηση 2 από τις 4 ψευδώς αρνητικές συντήξεις για TSO Comprehensive (EU) με την RNGS1 και 2 από τις 9 σύμφωνες συντήξεις για το TSO Comprehensive (EU) και την RNGS1. Συμπεριλήφθηκαν πέντε αρνητικά δείγματα σύντηξης με την εξέταση κάθε θετικού δείγματος σύντηξης για να διασφαλιστεί η ειδικότητα. Δεκαοκτώ συντήξεις δεν εξετάστηκαν με ddPCR λόγω αδυναμίας σχεδιασμού εκκινητών/ανιχνευτών, πολλαπλών γονιδίων-«εταίρων» για τη σύντηξη ή ανεπαρκούς εναπομένουσας ποσότητας υλικού FFPE. Για την ddPCR, σχεδιάστηκαν εκκινητές και ανιχνευτές σε σύγκριση με τα παρατηρούμενα σημεία θραύσης στον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU).

Συνολικά, ανιχνεύτηκαν 52 συντήξεις με ddPCR, 41 από αυτές τις συντήξεις αντιστοιχίστηκαν από το TSO Comprehensive (EU), αλλά δεν αντιστοιχίστηκαν ή δεν μπορούσαν να αντιστοιχιστούν από την RNGS1. Εννέα συντήξεις αντιστοιχίστηκαν από την ddPCR, αλλά ήταν αρνητικές στο TSO Comprehensive (EU) ή στην RNGS1. Δύο θετικές με ddPCR συντήξεις επιβεβαίωσαν τις 2 σύμφωνες συντήξεις για το TSO

Comprehensive (EU) και την RNGS1. Δεν ανιχνεύτηκε καμία σύντηξη με ddPCR για τα 2 επαναξιολογημένα ψευδώς αρνητικά TSO Comprehensive (EU) με την RNGS1. Ωστόσο, αυτά καταμετρήθηκαν ως ψευδώς αρνητικά με βάση τη σύγκριση της RNGS1.

Από τα 255 δείγματα, επιλέχθηκαν 35 δείγματα για τη μελέτη επειδή ήταν θετικά στη σύντηξη με προσδιορισμό προκατόχου TSO Comprehensive (EU) ή με προσδιορισμό προκατόχου. Η απόδοση για αυτά τα χαρακτηρισμένα δείγματα προσαρμόστηκε με τη χρήση ενός μέσου επιπολασμού σύντηξης. Η συνδυασμένη απόδοση σε χαρακτηρισμένα και μη χαρακτηρισμένα δείγματα χρησιμοποίησε σταθμισμένο μέσο όρο αντίστροφης διακύμανσης. Τα σύμφωνα αποτελέσματα για συντήσεις παρατίθενται στον [Πίνακα 80](#).

Οι 66 συντήσεις (54 μοναδικές συντήσεις) που ήταν σύμφωνες με τη σύνθετη μέθοδο αντιπροσώπευαν 43 γονίδια στο πάνελ του TSO Comprehensive (EU). Ωστόσο, οι συντήσεις είναι κατάλληλες για αναφορά μόνο από τα 23 γονίδια που υποδεικνύονται στον [Πίνακα 80](#).

Πίνακα 80 Σύνοψη συμφωνίας για τις συντήσεις RNA

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

* Διάστημα εμπιστοσύνης υπολογισμένο από το bootstrap.

Σύγκριση με τη μέθοδο FISH για τις συντήσεις ROS1 και ALK

Είκοσι πέντε δείγματα NSCLC εξετάστηκαν με FISH τόσο για τη σύντηξη ROS1 όσο και για τη σύντηξη ALK και 5 πρόσθετα δείγματα NSCLC εξετάστηκαν για τη σύντηξη ROS1, αντίστοιχα. Οκτώ δείγματα δεν εγκρίθηκαν για τη μέθοδο FISH για ROS1 λόγω ανεπαρκούς ιστού. Ανιχνεύτηκαν δύο συντήσεις ROS1 και μία σύντηξη ALK τόσο με το TSO Comprehensive (EU) όσο και με την FISH. Δεν παρατηρήθηκαν ασύμφωνα αποτελέσματα. Ο [Πίνακα 81](#) συνοψίζει τα αποτελέσματα συμφωνίας του TSO Comprehensive (EU) και της μεθόδου FISH για τις συντήσεις ROS1 και ALK.

Πίνακα 81 Σύνοψη των αποτελεσμάτων συμφωνίας του TSO Comprehensive (EU) και της μεθόδου FISH για τις συντήσεις ROS1 και ALK

ALK+ROS1	Θετική με FISH	Αρνητική με FISH
Θετικό με TSO Comprehensive (EU)	3	0
Αρνητικό με TSO Comprehensive (EU)	0	44
Σύνολο	3	44
Ποσοστιαία συμφωνία	PPA: 100% (3/3) 95% CI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95% CI: [92%, 100%]

Εγκυρότητα δείγματος

Η εγκυρότητα του δείγματος (πρώτη προσπάθεια) μετρήθηκε για 181 μοναδικά δείγματα RNA και 272 μοναδικά δείγματα DNA από ιστοτεμάχια FFPE ηλικίας ≤5 ετών. Αυτά τα δείγματα επιλέχθηκαν με βάση τον τύπο ιστού και το διαθέσιμο υλικό. Η εγκυρότητα του προσδιορισμού ήταν άγνωστη. Οι μετρήσεις ποιοτικού

ελέγχου της βιβλιοθήκης πρέπει να είναι έγκυρες για να θεωρηθεί έγκυρος ο τύπος παραλλαγής. Η εγκυρότητα του δείγματος αξιολογήθηκε ξεχωριστά για καθέναν από τους τύπους παραλλαγών (μικρές παραλλαγές DNA/TMB, MSI, γονιδιακές ενισχύσεις, συντήξεις/παραλλαγές θραυσμάτων) και παρατίθενται στον [Πίνακα 82](#). Προβλέπεται μια πρόσθετη μείωση στην εγκυρότητα του MSI κατά 1% για μπλοκ FFPE ηλικίας ≤ 2 ετών λόγω της αποστολής αντιδραστηρίων.

Πίνακα 82 Εγκυρότητα δείγματος

Τύπος παραλλαγής	Εγκυρότητα δείγματος
Παραλλαγές συντήξεων/ματίσματος (RNA)	76%
Μικρές παραλλαγές DNA/TMB	75%
MSI	72%
Γονιδιακή ενίσχυση	94%

Σύνοψη αναλυτικής επικύρωσης για αξιόσιες προσδιορισμού προφίλ όγκου

Με βάση τα δεδομένα ορίου ανίχνευσης, πιστότητας, αναπαραγωγιμότητας και ακρίβειας, το TSO Comprehensive (EU) έχει επικυρωθεί αναλυτικά για τα παρακάτω:

- Μικρές παραλλαγές DNA — SNV, MNV, προσθήκες και διαγραφές.
- TMB
- MSI
- Γονιδιακές ενισχύσεις MET και ERBB2 (HER2) (Ανατρέξτε στον [Πίνακα 2](#)).
- 23 γονίδια για τα οποία μπορούν να ανιχνευτούν συντήξεις (Ανατρέξτε στον [Πίνακα 2](#)).
- Παραλλαγές ματίσματος EGFR και MET (Ανατρέξτε στον [Πίνακα 2](#)).

Κλινικές επιδόσεις NTRK

Για την επικύρωση του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) ως συνοδευτικής διαγνωστικής εξέτασης (CDx) για την επιλογή ασθενών για θεραπεία με VITRAKVI (λαροτροκτινίμη), δείγματα από ασθενείς που εντάχθηκαν στις κλινικές δοκιμές για τη λαροτροκτινίμη (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, που αναφέρονται συλλογικά ως δείγματα δοκιμής για τη λαροτροκτινίμη) με τη χρήση της καταληκτικής ημερομηνίας συλλογής δεδομένων στις 15 ΙΟΥΛ 2019, συμπληρωμένα με δείγματα ιστού FFPE εμπορικής προέλευσης, εξετάστηκαν για την υποστήριξη μιας μελέτης ακρίβειας του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) και μιας μελέτης κλινικής γεφύρωσης.

Η NCT02122913 ήταν μια πολυκεντρική, ανοικτής επισημάνσης, φάσης 1 μελέτη κλιμάκωσης της δόσης σε ενήλικες ασθενείς με προχωρημένους συμπαγείς όγκους (όλοι οι συμμετέχοντες) που δεν επιλέχθηκαν για θετικό στη σύντηξη NTRK καρκίνο. Μετά το τμήμα κλιμάκωσης δόσης της μελέτης, ξεκίνησε μια επέκταση

δόσης για ασθενείς με τεκμηριωμένο θετικό στη σύντηξη NTRK καρκίνο και για ασθενείς για τους οποίους ο ερευνητής πίστευε ότι θα μπορούσαν να ωφεληθούν από έναν εξαιρετικά εκλεκτικό αναστολέα TRK. Η NAVIGATE NCT02576431 είναι μια υπό εξέλιξη, πολυκεντρική, ανοικτής επισήμανσης, φάσης 2 μελέτη τύπου basket σε ασθενείς ηλικίας 12 ετών και άνω με υποτροπιάζοντες προχωρημένους συμπαγείς όγκους με τεκμηριωμένη σύντηξη NTRK, όπως αξιολογήθηκε από εξωτερικό εργαστήριο. Η SCOUT NCT02637687 είναι μια υπό εξέλιξη, πολυκεντρική, ανοικτής επισήμανσης, φάσης 1/2 μελέτη σε παιδιατρικούς ασθενείς ηλικίας από τη γέννηση έως 21 ετών με προχωρημένους συμπαγείς ή πρωτοπαθείς όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος (CNS).

Από τους θετικούς στη σύντηξη NTRK ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU), 164 διαμόρφωσαν το διευρυμένο σύνολο δεδομένων κύριας αποτελεσματικότητας της λαροτροκτινίμης (ePAS4).

Μελέτη ακρίβειας για ανίχνευση συντήξεων NTRK1, NTRK2, NTRK3

Η ακρίβεια του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση συντήξεων NTRK (NTRK1, NTRK2 ή NTRK3) σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους καταδείχθηκε με την αξιολόγηση της συμφωνίας των αποτελεσμάτων της σύντηξης NTRK μεταξύ του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) και μιας επικυρωμένης ορθογώνιας μεθόδου με βάση το NGS.

Διεξήχθη μια αναδρομική, μη παρεμβατική μελέτη. Εξετάστηκαν δείγματα δοκιμής για τη λαροτροκτινίμη και συμπληρωματικά δείγματα με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) σε ένα εξωτερικό κέντρο και με μια ορθογώνια μέθοδο σε ένα κεντρικό εργαστήριο. Η ακρίβεια των αντιστοιχίσεων συντήξεων NTRK του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) αξιολογήθηκε σε σχέση με την ορθογώνια μέθοδο. Υπολογίστηκε η θετική ποσοστιαία συμφωνία (PPA), η αρνητική ποσοστιαία συμφωνία (NPA) και τα σχετιζόμενα αμφίπλευρα διαστήματα εμπιστοσύνης (CI) 95%.

Εξετάστηκαν 516 δείγματα με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) ή/και την ορθογώνια μέθοδο. Από αυτά τα δείγματα, 499 εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους. Δεκαεπτά από τα 516 δείγματα δεν εξετάστηκαν με έναν από τους προσδιορισμούς λόγω αποτυχημένης εκχύλισης, άγνωστης αιτίας (για την ορθογώνια μέθοδο) ή απόκλισης από το πρωτόκολλο. Από τα 499 δείγματα που εξετάστηκαν και με τις δύο μεθόδους, 170 (34,1%) ήταν δείγματα της δοκιμής για τη λαροτροκτινίμη και 329 (65,9%) ήταν συμπληρωματικά δείγματα.

Μια διασταυρούμενη πινακοποίηση των αποτελεσμάτων για τα 499 δείγματα παρατίθεται στον [Πίνακα 83](#). Από τα 499 δείγματα, 85 δείγματα είχαν μη έγκυρα αποτελέσματα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU). Από αυτά τα 85, 53 είχαν επίσης μη έγκυρα αποτελέσματα ορθογώνιας μεθόδου. Επτά επιπλέον δείγματα είχαν μη έγκυρα αποτελέσματα ορθογώνιας μεθόδου. Έτσι, 407 από τα 499 δείγματα είχαν έγκυρα αποτελέσματα και με τις δύο μεθόδους.

Πίνακα 83 Μελέτη ακρίβειας NTRK: Διασταυρούμενη πινακοποίηση του αποτελέσματος του TSO Comprehensive (EU) έναντι του αποτελέσματος της ορθογώνιας μεθόδου για ανίχνευση συντήξεων NTRK

Αποτέλεσμα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU)	Αποτέλεσμα της ορθογώνιας μεθόδου			
	Θετικό για σύντηξη NTRK	Αρνητικό για σύντηξη NTRK	Μη έγκυρο	Σύνολο
Θετικό για σύντηξη NTRK	114	16	1	131
Αρνητικό για σύντηξη NTRK	4	273	6	283
Μη έγκυρα*	4	28	53	85
Σύνολο	122	317	60	499

* Τα μη έγκυρα αποτελέσματα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) προέρχονται από το επίπεδο δείγματος και εκτέλεσης.

Οι αναλύσεις συμφωνίας, εξαιρουμένων και συμπεριλαμβανομένων μη έγκυρων TSO Comprehensive (EU) αποτελεσμάτων του προσδιορισμού, εμφανίζονται στον [Πίνακα 84](#). Εκτός από τα μη έγκυρα αποτελέσματα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU), το PPA ήταν 96,6% (114/118, 95% CI: 91,5% – 99,1%) και το NPA ήταν 94,5% (273/289, 95% CI: 91,2% – 96,8%).

Πίνακα 84 Μελέτη ακρίβειας NTRK: PPA και NPA του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) σε σύγκριση με το αποτέλεσμα της ορθογώνιας μεθόδου για την ανίχνευση συντήξεων NTRK

Μέτρο συμφωνίας	Εξαιρουμένων μη έγκυρων αποτελεσμάτων του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU)		Συμπεριλαμβανομένων μη έγκυρων αποτελεσμάτων του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU)	
	Συμφωνία, % (n/N)	95% CI*	Συμφωνία, % (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 με βάση την (ακριβή) μέθοδο Clopper-Pearson.

Κλινική μελέτη γεφύρωσης για ανίχνευση συντήξεων NTRK1, NTRK2, NTRK3

Η κλινική εγκυρότητα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ανίχνευση συντήξεων NTRK1, NTRK2 ή NTRK3 σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους που μπορεί να ωφεληθούν από τη θεραπεία με λαροτροκτινίμη καταδείχθηκε σε μια κλινική μελέτη γεφύρωσης. Η μελέτη διεξήχθη για την αξιολόγηση της κλινικής αποτελεσματικότητας του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για την ταυτοποίηση ασθενών θετικών στη σύντηξη NTRK1, NTRK2 ή NTRK3 για θεραπεία με λαροτροκτινίμη και για την αξιολόγηση της

συμφωνίας μεταξύ της μεθόδου του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) και της μεθόδου τοπικής εξέτασης (LT) (που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της κατάστασης σύντηξης NTRK για τις κλινικές δοκιμές για τη λαροτροκτινίμπη).

Οι μέθοδοι LT περιλάμβαναν προσδιορισμούς NGS, φθορίζοντα in situ υβριδισμό (FISH), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και NanoString. Συντήξεις NTRK (ETV6 NTRK3) συνήχθησαν για ασθενείς με βρεφικό ινοσάρκωμα, οι οποίοι είχαν τεκμηριωμένη μετατόπιση ETV6 που προσδιορίστηκε με FISH. Οι περισσότεροι από τους 235 ασθενείς της δοκιμής για τη λαροτροκτινίμπη με γνωστή κατάσταση σύντηξης NTRK είχαν εξεταστεί με μεθόδους NGS.

Μέχρι την καταληκτική ημερομηνία συλλογής δεδομένων της 15ης Ιουλίου 2019, εντάχθηκαν 279 ασθενείς. Από τους 279 ασθενείς, 208 ήταν θετικοί στη σύντηξη NTRK. Από τους 208 θετικούς ασθενείς, 164 διαμόρφωσαν την ePAS4 λαροτροκτινίμης.

Το πρωτεύον τελικό σημείο για την ανάλυση της αποτελεσματικότητας της λαροτροκτινίμης ήταν το συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης (ORR) σύμφωνα με την αξιολόγηση της ανεξάρτητης επιτροπής δεοντολογίας (IRC) σε ένα συγκεντρωτικό σύνολο δεδομένων από τις τρεις κλινικές μελέτες. Το ORR αξιολογήθηκε με βάση το ποσοστό των ασθενών με βέλτιστη συνολική ανταπόκριση επιβεβαιωμένης πλήρους ανταπόκρισης ή επιβεβαιωμένης μερικής ανταπόκρισης με βάση τα κριτήρια RECIST, έκδοση 1.1. Το ORR στην ePAS4 λαροτροκτινίμης ήταν 72,6% (95% CI [65,1%, 79,2%]) και περιλάμβανε ασθενείς με 16 διαφορετικούς τύπους όγκων.

Καταγραφή δειγμάτων

Το σετ δειγμάτων περιλάμβανε την αναπαράσταση ενός ευρέος φάσματος τύπων όγκων και παιδιατρικών και ενήλικων δειγμάτων ασθενών.

Στις μελέτες για τη λαροτροκτινίμπη εντάχθηκαν 279 ασθενείς έως τις 15 ΙΟΥΛ 2019. Από αυτούς, 235 ασθενείς είχαν γνωστή κατάσταση σύντηξης NTRK, όπως προσδιορίζεται με μια μέθοδο LT: 208 ήταν θετικοί και 27 ήταν αρνητικοί. Για 44 ασθενείς, η κατάσταση σύντηξης NTRK ήταν άγνωστη, καθώς δεν απαιτήθηκε εξέταση για την καταλληλότητα των ασθενών στις φάσεις κλιμάκωσης της δόσης των μελετών NCT02122913 και SCOUT NCT02637687. Για την κλινική μελέτη γεφύρωσης του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU), δείγματα από ασθενείς της δοκιμής για τη λαροτροκτινίμπη που εντάχθηκαν έως τις 15 ΙΟΥΛ 2019 με γνωστή κατάσταση σύντηξης NTRK (208 θετικοί ασθενείς και 27 αρνητικοί ασθενείς) και τα συμπληρωματικά δείγματα που προσδιορίστηκαν ως αρνητικά στη σύντηξη NTRK με αντιπροσωπευτικές μεθόδους LT ήταν επιλέξιμα για αυτήν τη μελέτη.

Από τα 208 θετικά δείγματα της δοκιμής για τη λαροτροκτινίμπη, τα 154 είχαν ένα δείγμα διαθέσιμο για εξέταση με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU). Από αυτούς, οι 138 είχαν έγκυρα αποτελέσματα. Δεκαπέντε δείγματα δεν ήταν έγκυρα λόγω αποτυχημένων μετρήσεων ποιότητας αλληλούχισης δείγματος και 1 δείγμα δεν εξετάστηκε λόγω απόκλισης από το πρωτόκολλο. Από τα 27 αρνητικά δείγματα της δοκιμής για τη λαροτροκτινίμπη, 24 είχαν ένα δείγμα διαθέσιμο για εξέταση. Από αυτά, τα 22 είχαν έγκυρα αποτελέσματα με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU). Δύο δείγματα ήταν μη έγκυρα λόγω αποτυχημένων μετρήσεων ποιότητας αλληλούχισης δειγμάτων.

Συμπληρωματικά δείγματα υποβλήθηκαν σε διαλογή με τη χρήση μίας από τις δύο αντιπροσωπευτικές μεθόδους LT. Περισσότερα από 350 δείγματα βρέθηκαν και εξετάστηκαν για περιεχόμενο όγκου. Από τα συμπληρωματικά δείγματα που πληρούσαν τις απαιτήσεις δείγματος, 266 εκχυλίστηκαν με επιτυχία και επιβεβαιώθηκαν ως αρνητικά στη σύντηξη NTRK με μια αντιπροσωπευτική μέθοδο LT. Από αυτά τα δείγματα, 260 ήταν διαθέσιμα για εξέταση με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU), από τα οποία τα 222 είχαν έγκυρα αποτελέσματα. Υπήρχαν 38 δείγματα που δεν ήταν έγκυρα λόγω αποτυχίας των μετρήσεων αλληλούχισης δείγματος (n = 25) ή αποτυχίας αλληλούχισης ανάλυσης (n = 13). Το συνολικό αρνητικό στη σύντηξη NTRK σετ αποτελούνταν από 222 συμπληρωματικά δείγματα και 22 δείγματα δοκιμής για τη λαοτροκτινίμνη.

Αποτελέσματα συμφωνίας

Συνολικά, εξετάστηκαν 437 δείγματα από την TSO Comprehensive (EU). Μεταξύ των 208 θετικών στη σύντηξη NTRK ασθενών, υπήρχαν 153 που είχαν διαθέσιμα δείγματα και εξετάστηκαν με το TSO Comprehensive (EU), αποδίδοντας 138 έγκυρα αποτελέσματα και 15 μη έγκυρα αποτελέσματα.

Η συμφωνία των αποτελεσμάτων του TSO Comprehensive (EU) ως προς τα αποτελέσματα των μεθόδων LT, με και χωρίς μη έγκυρα αποτελέσματα TSO Comprehensive (EU), παρατίθεται στον [Πίνακα 85](#).

Πίνακα 85 Κλινική μελέτη γεφύρωσης NTRK: Συμφωνία μεταξύ του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) και των μεθόδων LT για την ανίχνευση συντήξεων NTRK

Μέτρο συμφωνίας	Εξαιρουμένον μη έγκυρον αποτελεσμάτων του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU)		Συμπεριλαμβανομένον μη έγκυρον αποτελεσμάτων του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU)	
	% συμφωνίας (n/N)	95% CI*	% συμφωνίας (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

* Τα αμφίπλευρα CI 95% υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την (ακριβή) μέθοδο Clopper-Pearson.

Η ανάλυση ευαισθησίας έναντι των ελλείποντων αποτελεσμάτων του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) κατέδειξε τη στιβαρότητα της ανάλυσης συμφωνίας. Τα ελλείποντα αποτελέσματα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για τους θετικούς στη σύντηξη NTRK LT ασθενείς (n = 70) καταλογίστηκαν χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο λογιστικής παλινδρόμησης. Οι εκτιμήσεις της συμφωνίας, συμπεριλαμβανομένων των καταλογισμένων τιμών παρατίθενται στον [Πίνακα 86](#).

Πίνακα 86 Κλινική μελέτη γεφύρωσης NTRK: Συμφωνία μεταξύ του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) και των μεθόδων LT για την ανίχνευση συντήξεων NTRK συμπεριλαμβανομένων των καταλογισμένων τιμών για θετικούς σε LT ασθενείς με ελλείποντα αποτελέσματα προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU)

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

Τα ελλείποντα αποτελέσματα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) για τους αρνητικούς στη σύντηξη LT ασθενείς δεν καταλογίστηκαν.

* Τα αμφίπλευρα CI 95% υπολογίστηκαν με βάση τη μέθοδο εκκίνησης πολλαπλού καταλογισμού. Η μέθοδος εκκίνησης πολλαπλού καταλογισμού είναι ένα βήμα τεχνικής bootstrap ενσωματωμένο στον πολλαπλό καταλογισμό (Schomaker and Heumann 2018).

Οι συμφωνίες μεταξύ του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) και των LT ανά τύπο μεθόδου (για παράδειγμα, RNA NGS, FISH) παρατίθενται στον [Πίνακα 87](#).

Πίνακα 87 Κλινική μελέτη γεφύρωσης NTRK: Συμφωνία μεταξύ της μεθόδου του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) και των μεθόδων LT για την ανίχνευση συντήξεων NTRK ανά τύπο μεθόδου LT

Τύπος μεθόδου LT	Μέτρο συμφωνίας	% συμφωνίας (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	Δεν υπολογίστηκε (1/1)	Δεν υπολογίστηκε
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Δεν υπολογίστηκε (0/0)	Δεν υπολογίστηκε
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Δεν υπολογίστηκε: για υποομάδες με αριθμό δειγμάτων <5, δεν υπολογίστηκαν στατιστικά στοιχεία συμφωνίας.

¹ Τα αμφίπλευρα CI 95% υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την (ακριβή) μέθοδο Clopper-Pearson.

² Περιλαμβάνει μεθόδους NGS που χρησιμοποιούν μόνο RNA και τόσο DNA όσο και RNA.

Από τα 437 δείγματα που εξετάστηκαν με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU), 24 είχαν ασύμφωνα αποτελέσματα με τις μεθόδους LT: 15 ήταν θετικά με τις LT και αρνητικά με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU) και 9 ήταν αρνητικά με τις LT και θετικά με τον προσδιορισμό TSO Comprehensive (EU). Από τα 24 δείγματα με ασύμφωνα αποτελέσματα, 8 εξετάστηκαν με μια μέθοδο DNA NGS LT, 14 με μια μέθοδο RNA NGS LT και 2 με FISH.

Μια επικυρωμένη ανεξάρτητη μέθοδος NGS επιβεβαίωσε αποτελέσματα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) σε 14 από τα 24 δείγματα με ασύμφωνα αποτελέσματα. Για τα υπόλοιπα 10 δείγματα, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) ήταν ασύμφωνα τόσο με τη μέθοδο LT όσο και με την ανεξάρτητη μέθοδο NGS.

Αποτελέσματα κλινικής αποτελεσματικότητας

Εντός της κοόρτης ePAS4, η αποτελεσματικότητα της λαροτροκτινίμης στον θετικό για TSO Comprehensive (EU), θετικό για LT πληθυσμό (97 ασθενείς, ORR=78,4%, 95% CI [68,8%, 86,1%]) ήταν παρόμοια με την αποτελεσματικότητα της λαροτροκτινίμης στον συνολικό πληθυσμό της ePAS4 (164 ασθενείς, ORR=72,6%, 95% CI [65,1%, 79,2%]) (Πίνακα 88). Από τους 97 θετικούς για TSO Comprehensive (EU) ασθενείς στην ePAS4, 28 (28,9%) ασθενείς είχαν πλήρη ανταπόκριση/πλήρη χειρουργική ανταπόκριση και 48 (49,5%) ασθενείς είχαν μερική ανταπόκριση.

Από τους 13 αρνητικούς για TSO Comprehensive (EU), θετικούς για LT πληθυσμούς, 1 (7,7%) παρουσίασε πλήρη ανταπόκριση και 2 (15,4%) παρουσίασαν μερική ανταπόκριση στη θεραπεία με λαροτροκτινίμη.

Πίνακα 88 Κλινική μελέτη γεφύρωσης NTRK: ORR για ασθενείς θετικούς για LT σύμφωνα με τα αποτελέσματα LT και TSO Comprehensive (EU) στην ePAS4

		Θετικό για σύντηξη LT N=164	TSO Comprehensive (EU) Θετικό και θετικό για LT N=97	TSO Comprehensive (EU) Αρνητικό και θετικό για LT N=13
Βέλτιστη συνολική ανταπόκριση, n (%)	Πλήρης ανταπόκριση	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Πλήρης χειρουργική ανταπόκριση	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Μερική ανταπόκριση	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Σταθερή νόσος	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Εξέλιξη νόσου	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Μη αξιολογήσιμο	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Ποσοστό συνολικής ανταπόκρισης	Αριθμός ασθενών, n	164	97	13
	Αριθμός ασθενών με 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)

Συντμήσεις: CR = Πλήρης ανταπόκριση, PR = Μερική ανταπόκριση, sCR = Πλήρης χειρουργική ανταπόκριση.

* Το αμφίπλευρο διάστημα εμπιστοσύνης 95% υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την (ακριβή) μέθοδο Clopper-Pearson.

Από 54 ασθενείς λείπουν αποτελέσματα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU).

Τα δεδομένα από αυτήν τη μελέτη υποστηρίζουν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα του προσδιορισμού TSO Comprehensive (EU) όταν χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση ασθενών με συμπαγείς όγκους με συντήξεις NTRK, οι οποίοι μπορεί να είναι κατάλληλοι για θεραπεία με λαρотреκτινίμη.

Βιβλιογραφία

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Προσπελάστηκε στις 3 Οκτωβρίου 2016.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Προσπελάστηκε στις 3 Οκτωβρίου 2016.

Ιστορικό αναθεωρήσεων

Αναθεώρηση	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ. 08	Μάιος 2025	Αφαιρέθηκε η αναφορά στις εκδόσεις λογισμικού και τους αριθμούς εξαρτημάτων. Ενημερωμένοι περιορισμοί της διαδικασίας: • Πληροφορίες νεκρωτικού ιστού. • Πληροφορίες περιεχομένου όγκου MSI. Ενημερώθηκαν: • Υποσημείωση NTC για εφαρμογή τόσο στις ελάχιστες όσο και στις μέγιστες βιβλιοθήκες. • Ο εξοπλισμός και τα υλικά απαριθμούν τις προδιαγραφές της πλάκας φυγοκέντρωσης και τα βήματα των πιπετών. • Υπολογισμός υπέρβασης SPB από 1,05x έως 1,15x. • Ορολογία για MET εξόνιο 14 del σε παράλειψη MET εξόνιο 14. Προσθήκες: • Σημείωση για SMB σε Στόχους Λήψης Ένα και Δύο. • Προετοιμασία για εισαγωγή προσδιορισμού αλληλουχίας. • Πρόσθετες πληροφορίες για τον υπερηχητή. Προστέθηκαν διευκρινίσεις και επικαιροποιήθηκαν τα αποτελέσματα για τα Χαρακτηριστικά απόδοσης: • Παρεμβαλλόμενες ουσίες. • Ακρίβεια για τη δημιουργία προφίλ όγκου και την εγκυρότητα του δείγματος. • Όριο ανίχνευσης Μελέτης 1 και 2. • Μελέτη ενδοεργαστηριακής ακρίβειας 1. • Μελέτη αναπαραγωγιμότητας 2. • Σταθερότητα βιβλιοθήκης και πληροφορίες αποθήκευσης βιβλιοθήκης. • Όριο τυφλού. Επικαιροποιήθηκε η γλωσσική διατύπωση και η γραμματική.

Αναθεώρηση	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ.07	Ιανουάριος 2024	• Προστέθηκαν πληροφορίες στους Περιορισμούς της Διαδικασίας: • Απαιτήσεις δείγματος νεκρωτικού ιστού και περιεχομένου όγκου για μεταλλάξεις MSI-υψ. και σωματικές μεταλλάξεις-οδηγούς. • Πιθανή παρεμβολή από την αιμοσφαιρίνη. • Όρια ανίχνευσης στο γονίδιο RET και αντιστοίχιση σύντηξης εκτός των ορίων του σχολιασμένου γονιδίου. • Οι διαγραφές γονιδίων δεν αναφέρονται. • Ενημερώθηκε για χρήση με το λογισμικό TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager, έκδοση 2.3.7. • Προστέθηκαν πληροφορίες στον απαιτούμενο αλλά μη παρεχόμενο εξοπλισμό και υλικά, συμπεριλαμβανομένων δύο πρόσθετων διαμορφώσεων της συσκευής παραγωγής υπερήχων. • Ενημερώθηκαν οι πληροφορίες δείγματος και βιολογικού δείγματος: • Περιεχόμενο νεκρωτικού ιστού. • Επιδράσεις της πρωτεΐνωσης K και της αιμοσφαιρίνης. • Φύλαξη FFPE καθηλωμένου σε αντικειμενοφόρο πλάκα και κεκαθαρμένου νουκλεϊκού οξέος. • Προστέθηκαν πληροφορίες για τη βελτίωση του χειρισμού αντιδραστηρίων, της ροής εργασιών και της αντιμετώπισης προβλημάτων αποτυχιών διεξαγωγής ποιοτικού ελέγχου. • Προστέθηκε πλαίσιο και σαφήνεια στα Χαρακτηριστικά απόδοσης: • Διασταυρούμενη μόλυνση • Αξιολόγηση του kit εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων • Παρεμβαλλόμενες ουσίες • Σταθερότητα νουκλεϊκών οξέων και FFPE καθηλωμένων σε αντικειμενοφόρο πλάκα • Κλινικές επιδόσεις NTRK • Επικαιροποιήθηκε η γλωσσική διατύπωση και η γραμματική

Αναθεώρηση	Ημερομηνία	Περιγραφή αλλαγής
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ.06	Φεβρουάριος 2023	• Πρόσθετες δηλώσεις στην ενότητα Περιορισμοί • Επικαιροποιήσεις στη γλωσσική διατύπωση για λόγους τήρησης συμβάσεων, γραμματικής και σαφήνειας • Διόρθωση των Πινάκων 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Δήλωση σχετικά με την παρουσία ιζημάτων στο αντιδραστήριο FSM • Επικαιροποιήθηκαν οι προδιαγραφές του θερμικού κυκλοποιητή και των προδιαγραφών του δοχείου στη λίστα Εξοπλισμός και Υλικά
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ.05	Σεπτέμβριος 2022	Επικαιροποιήθηκαν οι πίνακες αναπαραγωγιμότητας της Μελέτης 2
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ.04	Ιούνιος 2022	• Προστέθηκαν κωδικοί είδους της μονάδας ολοκληρωμένης ανάλυσης TSO Comprehensive έκδ. 2.3.5 • Αφαιρέθηκαν κωδικοί είδους της μονάδας ανάλυσης TSO Comprehensive έκδ. 2.3.3 • Επικαιροποιήθηκε η ορολογία στην ενότητα Όριο τυφλού
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ.03	Απρίλιος 2022	• Προστέθηκαν πληροφορίες χαρακτηριστικών επιδόσεων που σχετίζονται με τις συντήξεις NTRK • Προστέθηκε η σήμανση ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΕΞΑΓΩΓΗ • Επικαιροποιήθηκε η δήλωση προβλεπόμενης χρήσης, για την προσθήκη της αξίωσης NTRK1-3 CDx • Διευρύνθηκαν οι πληροφορίες εξαρτημάτων του προϊόντος για να συμπεριλάβουν τους κωδικούς είδους του λογισμικού
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ.02	Φεβρουάριος 2022	• Διόρθωση σφάλματος αναφοράς πίνακα • Προστέθηκε περιορισμός που σχετίζεται με παραλλαγές βλαστικής σειράς και σωματικές παραλλαγές • Διευκρινίστηκε η διατύπωση σχετικά με την ανίχνευση γονιδιακής ενίσχυσης
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ.01	Δεκέμβριος 2021	• Επικαιροποιήθηκαν οι περιορισμοί της διαδικασίας • Διευκρινίστηκαν οι προδιαγραφές της μαγνητικής βάσης και του θερμικού κυκλοποιητή στις λίστες εξοπλισμού και υλικών
Αρ. εγγράφου 200007789 έκδ.00	Νοέμβριος 2021	Αρχική έκδοση

Διπλ έματα ευρεσιτεχνίας και εμπορικά σήματα

Το παρόν έγγραφο και τα περιεχόμενά του αποτελούν ιδιοκτησία της Illumina, Inc. και των συνδεδεμένων εταιρειών της («Illumina») και προορίζονται αποκλειστικά για τη συμβατική χρήση του πελάτη της σε συνδυασμό με τη χρήση του(-ων) προϊόντος(-ων) που περιγράφονται στο παρόν έγγραφο και για κανέναν άλλον σκοπό. Απαγορεύεται η χρήση ή η διανομή του παρόντος εγγράφου και των περιεχομένων του για οποιονδήποτε άλλον σκοπό ή/και άλλη κοινοποίηση, αποκάλυψη ή αναπαραγωγή τους με οποιονδήποτε τρόπο χωρίς την πρότερη έγγραφη συναίνεση της Illumina. Η Illumina δεν μεταβιβάζει διά του παρόντος εγγράφου καμία άδεια δυνάμει διπλώματος ευρεσιτεχνίας, εμπορικού σήματος, πνευματικού δικαιώματος ή δικαιωμάτων κοινού δικαίου της.

Οι οδηγίες στο παρόν έγγραφο πρέπει να τηρούνται αυστηρά και με ακρίβεια από ειδικευμένο και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθή και ασφαλή χρήση του(-ων) προϊόντος(-ων) που περιγράφονται στο παρόν. Όλα τα περιεχόμενα του παρόντος εγγράφου πρέπει να αναγνωσθούν και να γίνουν πλήρως κατανοητά πριν από τη χρήση του(-ων) εν λόγω προϊόντος(-ων).

ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΜΗ ΠΛΗΡΟΥΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΡΗΣΗΣ ΜΕ ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΟΔΗΓΙΩΝ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ, ΜΠΟΡΕΙ ΝΑ ΠΡΟΚΛΗΘΕΙ ΖΗΜΙΑ ΣΤΟ(-Α) ΠΡΟΪΟΝ(-ΤΑ), ΤΡΑΥΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ, ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΧΡΗΣΤΩΝ Ή ΑΛΛΩΝ, ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΑΛΛΗ ΥΛΙΚΗ ΖΗΜΙΑ, ΚΑΙ ΘΑ ΚΑΤΑΣΤΕΙ ΑΚΥΡΗ Η ΕΓΓΥΗΣΗ ΠΟΥ ΙΣΧΥΕΙ ΓΙΑ ΤΟ(-Α) ΠΡΟΪΟΝ(-ΤΑ).

Η ILLUMINA ΔΕΝ ΑΝΑΛΑΜΒΑΝΕΙ ΚΑΜΙΑ ΕΥΘΥΝΗ ΠΟΥ ΑΠΟΡΡΕΕΙ ΑΠΟ ΕΣΦΑΛΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ(-ΩΝ) ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ(-ΩΝ) ΠΟΥ ΠΕΡΙΓΡΑΦΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΠΑΡΟΝ [ΣΥΜΠΕΡΙΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΤΩΝ ΕΞΑΡΤΗΜΑΤΩΝ ΤΟΥ(-ΟΥΣ) Ή ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ].

© 2025 Illumina, Inc. Με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Όλα τα σήματα κατατεθέντα είναι ιδιοκτησία της Illumina, Inc. ή των αντίστοιχων κατόχων τους. Για συγκεκριμένες πληροφορίες σχετικά με τα σήματα κατατεθέντα, ανατρέξτε στην ιστοσελίδα www.illumina.com/company/legal.html.

Στοιχεία επικοινωνίας



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 Η.Π.Α.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (εκτός Βορείου Αμερικής)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Επισήμανση προϊόντος

Για μια πλήρη αναφορά στα σύμβολα που μπορεί να εμφανίζονται στη συσκευασία και την επισήμανση του προϊόντος, ανατρέξτε στο υπόμνημα συμβόλων για το κιτ σας στη διεύθυνση support.illumina.com, στην καρτέλα *Documentation* (Τεκμηρίωση).