

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Pakendi infoleht

KASUTAMISEKS IN VITRO DIAGNOSTIKAS. AINULT EKSPORDIKS.

Kasutusotstarve

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) on *in vitro* diagnostiline analüüs, mis kasutab suunatud uue põlvkonna sekveneerimist, et avastada 517 geeni variante pahaloomulise soliidtuumoriga vähipatsientidelt võetud formaliinis fikseeritud parafiini sisestatud (FFPE) kasvaja koeproovidest eraldatud nukleiinhapete abil, kasutades seadet Illumina® NextSeq™ 550Dx. Analüüsi saab kasutada ühe nukleotiidi variantide, mitme nukleotiidi variantide, insertsoonide, deletsioonide ja geeniamplifikatsioonide avastamiseks DNA-st ning geenifusioonide ja splaissvariantide avastamiseks RNA-st. Analüüs esitab ka kasvaja mutatsioonikoormuse (TMB) skoori ja mikrosatelliitide ebastabiilsuse (MSI) oleku.

Analüüs on mõeldud kasutamiseks kaasdiagnostika abivahendina, et tuvastada vähipatsiente, keda oleks võimalik ravida Tabel 1 loetletud sihitud ravimeetoditega, järgides heakskiidetud ravitoote märgistust. Lisaks on analüüs mõeldud pakkuma kasvaja profiili koostamise teavet, mida kvalifitseeritud tervishoiuspetsialistid saavad kasutada kooskõlas erialaste suunistega, ning see ei esita ühegi konkreetse ravitoote lõplikke ega normatiivseid kasutusjuhiseid.

Tabel 1 Kaasdiagnostika näidustus

Kasvaja tüüp	Biomarkerid	Sihitud ravi
Soliidtuumorid	NTRK1, NTRK2 and NTRK3 Gene Fusions (NTRK1, NTRK2 ja NTRK3 geenide fusioonid)	VITRAKVI® (larotrekiniib)

Analüüsi kokkuvõte ja selgitus

Kliiniline kirjeldus

Vähk on kogu maailmas peamine surmapõhjus ja võib alguse saada mis tahes koest.^{1, 2} Vähi geneetilise aluse analüüsimisel on oluline roll patsientide, kellele suunatud ravi tooks kasu, tuvastamisel ja uute ravimeetodite väljatöötamisel. Vähi tekkimisse või progresseerumisse on kaasatud paljud geenid ning paljudel vähkidel esineb mitmesuguseid variante, mis neid geene ja nende funktsioone mõjutavad. Need variandid võivad hõlmata geenimutatsioone nagu ühe nukleotiidi variandid (SNV-d), mitme nukleotiidi variandid (MNV-d), insertsoonid või deletsioonid, geeniamplifikatsioonid, geenifusioonid ja splaissvariandid. Vähi geenimutatsiooni veel üks

tagajärg on neoantigeenide teke, mis kutsuvad esile vähispetsiifilise immuunvastuse. Kasvaja mutatsiooniseisundit saab esitada TMB ja MSI abil, mis on kasvaja neoantigeeni tekkega seotud genoomi signatuurid.

TruSight Oncology Comprehensive on uue põlvkonna sekveneerimise (NGS) ülegenoomse profileerimise (CGP) analüüs, mis hindab üldjoontes geenivariante suurel vähiga seotud geenipaneelil, vt [Tabel 2](#). Analüüs avastab väikesed variandid 517 geenis, lisaks geeniamplifikatsioonid, -fusioonid ja splaissvariandid, nagu on näidatud [Tabel 2](#). Analüüsiga on kaetud kodeeriv järjestus kõigi geenide puhul, väljaarvatud TERT, mille korral on kaetud üksnes promootori piirkond, ning analüüs hindab TMB skoori ja MSI olekut. Need analüüsi sihtmärgid hõlmavad kutseorganisatsioonide viidatud sisu ja muid olulisi USA-põhiseid juhiseid. TSO Comprehensive analüüsi kavandamist mõjutasid ka sõltumatud konsortsiumi väljaanded ja hilise staadiumi farmatseutilised uuringud.

Variantide määramisest välja jäetud piirkondade loendi leiate failist *TruSight Oncology ComprehensiveBlock List* (dokument nr 200009524), mis on saadaval Illumina [toe veebilehel](#).

[Tabel 2](#) on toodud neli variandi tüübi kategooriat: väike DNA variant (S), geeniamplifikatsioon (A), fusioon (F) ja splaissvariant (Sp). DNA väikesed variandid on muu hulgas SNV-d, MNV-d, insertioonid ja deletsioonid.

Tabel 2 TSO Comprehensive (EU) analüüsi geenipaneel

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

Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp	Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp	Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	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

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

Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp	Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp	Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp
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	SOC31	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPSR2	S, F
140	54206	ERRF1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S

Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp	Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp	Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp
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	VTGN1	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	ZFXH3	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	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu

Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp	Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp	Nr	Entrezi ID	Geen	Variandi tüüp
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu

Protseduuri põhimõtted

Analüüs TSO Comprehensive (EU) on jaotatud analüüs, mida tehakse käsitsi ja mille tegemisel kasutatakse sisendmaterjalina eraldatud nukleiinhappeid. Formaliiniga fikseeritud parafiiniga kaetud (FFPE) koest eraldatud DNA-d ja/või RNA-d kasutatakse teekide valmistamiseks, mida seejärel rikastatakse vähiga seotud geenidega ning sekveneeritakse NextSeq 550Dx Instrument.

TSO Comprehensive (EU) analüüs hõlmab järgmisi protsesse.

- **Teekide valmistamine ja rikastamine** – RNA puhul muundatakse kokku 40 ng kaheaaheliseks täiendavaks DNA-ks (cDNA). Genoomse DNA (gDNA) puhul lõigatakse 40 ng gDNA-d väikesteks fragmentideks. Universaaladapterid sekveneerimiseks ligeeritakse cDNA ja gDNA fragmentidele. Adapterjärjestused P5 ja P7 lisatakse igasse teeki, et võimaldada sekveneerimise ajal teegifragmentide kinnistumist läbivooluküveti pinnale. Adapterid sisaldavad i5 ja i7 indeksjärjestusi iga üksiku proovi tuvastamiseks ning gDNA proovidest pärit teekide korral üksikute molekulide tuvastamiseks kordumatute molekulitunnustega (Unique Molecular Identifiers, UMI). Seejärel rikastatakse teeke kindlate huvipakkuvate geenide jaoks, kasutades kinnistamismeetodit. Biotinüülitud sondijärjestused, mis ulatuvad üle analüüsiga sihitud huvipakkuvate geenipiirkondade, hübridiseeritakse teekide külge. Sondid ja hübridiseeritud sihitud teegid isoleeritakse sihtimata teekidest streptavidiiniga kaetud magnetosakeste kinnistamise teel. Sihitud rikastatud teegid pestakse ja amplifitseeritakse. Seejärel normaliseeritakse iga rikastatud teegi kogus kerakestemeetodil, et tagada sekveneerimise jaoks kogumisse lisatud teekide võrdne esindatus.
- **Sekveneerimine ja esmane analüüs** – normaliseeritud rikastatud teegid lisatakse kogumisse ja klasterdatakse läbivooluküvetile, seejärel sekveneeritakse seadmes NextSeq 550Dx sünteesi abil (SBS-meetod). SBS-meetod kasutab pöörduvat terminaatorit, et avastada fluorestsentsmärgistusega üksiku deoksünukleotiidi trifosfaadi (dNTP) alused nende inkorporeerimisel kasvavatesse DNA-ahelatesse. Iga sekveneerimistsükli käigus lisatakse nukleiinhapete ahelasse üks dNTP. dNTP märgistus toimib polümerisatsiooni terminaatorina. Pärast iga dNTP inkorporatsiooni kuvatakse fluorestsentsvärv aluse tuvastamiseks ja seejärel lõhestatakse, et võimaldada järgmise nukleotiidi inkorporeerimist. Neli pöörduva terminaatoriga seotud dNTP-d (A, G, T ja C) on üksikute eraldi molekulidena. Tulemusena minimeerib loomulik konkurents inkorporeerimisnihet. Esmase analüüsi käigus tehakse aluste nimetamised iga sekveneerimistsükli ajal otse signaalitugevuse mõõtmiste põhjal, saades tulemuseks aluste kaupa sekveneerimise. Igale aluse nimetusele määratakse kvaliteediskoor.
- **Teisene analüüs** – Tarkvara Local Run Manager analüüsimoodul TruSight Oncology Comprehensive (EU) on seadmes NextSeq 550DxLocal Run Manager (LRM) tarkvara osana, et hõlbustada TSO Comprehensive (EU) käituse seadistamist ja teha sekveneerimistulemuste teisene analüüs. Teisene analüüs hõlmab käituse töötlemise kehtivuse kontrolli ja kvaliteedikontrolli ning seejärel demultipleksimist, FASTQ-faili loomist, joondamist ja variantide avastamist. Demultipleksimine eraldab teegikogumitest andmed kordumatute järjestusindeksite põhjal, mis lisati teekide valmistamise käigus. Luuakse FASTQ-vahefailid, mis sisaldavad

sekveneerimislugemeid iga proovi kohta ja kvaliteediskoore, v.a lugemeid klastritest, mis filtrit ei läbinud. Seejärel joondatakse sekveneerimislugemid võrdlusgenoomiga, et tuvastada järjestuste vaheline seos, ja sarnasuspiirkondade alusel määratakse skoor. Joondatud lugemid kirjutatakse failidesse BAM-vormingus. Analüüsitarkvara kasutab DNA- ja/või RNA-proovidest loodud teekide puhul eraldi algoritme DNA väikeste variantide, geeniamplifikatsioonide, DNA-proovide puhul TMB ja MSI ning RNA-proovide puhul fusioonide ja splaissvariantide avastamiseks. Analüüsi tarkvaramoodul loob mitu väljundit, sh sekveneerimismõõdikud ja variantide avastamise vormingu failid (VCF). VCF-failid sisaldavad teavet variantide kohta, mis on leitud võrdlusgenoomi kindlatel positsioonidel. Sekveneerimismõõdikud ja individuaalsed väljundfailid luuakse iga proovi kohta. Sekundaarse ja kolmanda taseme analüüsi üksikasju vt *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoogu juhend (dokument nr 200008661)*.

- **Kolmanda taseme analüüs** – analüüsimooduliga Tarkvara Local Run Manager analüüsimoodul TruSight Oncology Comprehensive (EU) läbiviidav kolmandane analüüs hõlmab TMB ja MSI arvutusi, kaasdiagnostikaga avastamist, variantide kasvaprofiili määramist kahele kliinilise olulisuse tasemele, kasutades teabebaasi (KB) ja koe tüüpi, ning koostab aruande. Kasvaja profiili määramisele võib viidata ka kui ülegenoomsele profileerimisele. Variantide tõlgendatud tulemused ning TMB ja MSI biomarkerite tulemused on kokku võetud TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemuste aruandes.

Protseduuri piirangud

Ainult *in vitro* diagnostiliseks kasutamiseks.

- Kasutamiseks ainult retsepti alusel. Analüüsi tuleb kasutada kliiniliste laborieeskirjade kohaselt.
- **Tabel 2** loetletud geneetiliste leidude kasutusotstarve ei ole ühegi ravitoote kasutamiseks ettekirjutav ega otsustav.
- TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemuste aruande jaotises „Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance“ (2. tase) (Tõendatud kliinilise tähtsusega geneetilised leiud) ja „Genomic Findings with Potential Clinical Significance“ (3. tase) (Võimaliku kliinilise tähtsusega geneetilised leiud) loetletud variantide puhul ei ole kliinilist kehtivust kontrollitud.
- Patsiendi raviotsused tuleb teha raviarsti sõltumatul meditsiinilisel otsusel, võttes arvesse patsiendi seisundit puudutavat asjakohast teavet, nagu patsiendi ja perekonna anamnees, meditsiinilised läbivaatused, teave muudest diagnostilistest analüüsides, ning patsiendi eelistusi, järgides asjaomase ringkonna ravistandardeid.
- FFPE proovide kvaliteet on väga muutuv. Proovimaterjalid, mis ei läbinud standardseid fikseerimisprotseduure, ei pruugi anda eraldatud nukleiinhappeid, mis vastaksid analüüsi kvaliteedikontrolli nõuetele (*Kvaliteedikontroll leheküljel 79*). Kauem kui viis aastat säilitatud FFPE plokid on näidanud väiksemat kehtivust.
- TSO Comprehensive (EU) toimivust proovides, mis on võetud siirdatud elundi või koega patsientidelt, ei ole hinnatud.
- Nekrootilise koe suur hulk ($\geq 23\%$) võib segada TSO Comprehensive (EU) analüüsi võimet avastada geeniamplifikatsioone ja RNA fusioone.

- Somaatilise juhi mutatsiooni tuvastamine võib olla ebausaldusväärne, kui kasvajasaldus (pindala järgi) on alla 20%.
- Mikrosatelliidi stabiilne (MS-stabiilne) tulemus võib olla ebausaldusväärne, kui kasvajasaldus on alla 30%. Mikrosatelliidi kõrge (MSI-kõrge) tulemus on õige sõltumata kasvajasaldusest.
- Koega seotud hemoglobiin vähendab MET splaissvariantide tugilugemeid.
- Tugevalt ümberpaigutatud genoomides deletsioonide ja vähenenud heterosügootsusega võib TSO Comprehensive (EU) analüüsi tarkvara ekslikult klassifitseerida DNA-proovi saastunuks (CONTAMINATION_SCORE > 3106 ja p-väärtus > 0,049).
- Negatiivne tulemus ei välista mutatsiooni olemasolu allpool analüüsi avastamispiiri (LoD).
- DNA väikeste variantide avastamise tundlikkust võivad mõjutada järgmised tingimused:
 - Vähese keerukusega genoomikontekst.
 - Variandi suurenenud pikkus.
- TMB skoorid võivad olla ebatäpsed järgmistes tingimustes:
 - Kasvajasaldus saavutab tasemed, kus iduliini ja somaatilise variandi alleelide esinemissagedused (VAF-id) koonduvad.
 - Populatsioonides, mis ei ole avalikes andmebaasides hästi esindatud.
- Geeniamplifikatsioonid on ainsad koopiarvu variandid, mille esitas TSO Comprehensive (EU). Analüüs ei teata geenide deletsioonidest.
- Analüüsitarkvaras TSO Comprehensive (EU) olevad fusioonide nimetamise algoritmid ei pruugi arvestada tõendeid lugemitest, mis ulatuvad väljapoole annoteeritud geenipiire.
- Fusioonide avastamise tundlikkust võivad mõjutada järgmised tingimused:
 - Teekide väike keerukus, mis annab analüüsi töövoos kõrvalekallete tõttu tulemuseks vähenenud toetavad lugemid (näiteks vt segamisetappe jaotises [RNA denatureerimine ja anniilimine leheküljel 43](#)).
 - Üksik geen ulatub üle mõlema murdepunkti.
 - Olukorrad, kus mitu fusiooni murdepunkti on üksteise lähedal ühe või mitme partneriga, mitu murdepunkti ja partnerit võidakse esitada ühe murdepunkti ning partnerina.
 - Insertide väikse mediaansuuruse järgi. Nõutav on inserti minimaalne mediaansuurus 80 bp, kuid vahemikus 80–100 bp tundlikkus väheneb.
 - Järjestuse väike keerukus või homoloogne genoomikontekst fusiooni murdepunktide ümber.
- Fusiooni kaasatud geenide resolutsiooni võib mõjutada see, kui fusiooni murdepunktid asuvad kattuvaid geene sisaldavates genoomipiirkondades. Analüüs esitab kõik geenid semikoolonitega eraldatult, kui murdepunktis kattub mitu geeni.
- Ebaühtlane kattuvus TERT-promootori piirkonnas võib väikese katvuse tõttu anda vastuseks No Result (Tulemus puudub).

- Annotatsioon või KB vead võivad põhjustada valepositiivse või valenegatiivse tulemuse, sh variandi loetlemise valel tasemel (tõendatud kliinilise tähtsusega geneetiliste leidude (2. tase) ja võimaliku kliinilise tähtsusega (3. tase) leidude vahel), või annotatsiooniteave aruandes võib olla vale. CDx-i tulemustes teatatud variante ei mõjuta annotatsioon ega KB-vead. Viga võib tekkida kolmest järgmisest allikast:
 - TSO Comprehensive (EU) variandi annotatsioon. 2 448 350 COSMIC v92 variantide analüüsi põhjal on veamäär ligikaudu 0,0027%, mistõttu on vea võimalus madal.
 - KB viga kureerimisprotsessi tõttu.
 - KB sisu asjakohasus muutub aja jooksul. Aruanne kajastab teavet KB versiooni kureerimise ajal.
- TSO Comprehensive (EU) esitab somaatilised variandid tõendatud kliinilise või võimaliku kliinilise tähtsusega variantide esitamisel. Ainult kasvajatestina on iduliini (pärilik) variantidest teatamine võimalik, kuid tahtmatu. TSO Comprehensive (EU) kasutab variantide teatamiseks KB-d, ilma et oleks selgelt märgitud, kas need on iduliini või somaatilise päritoluga.
- KB sisaldab ainult ravi, diagnostika ja prognostiliste markerite seoseid, mis kehtivad kindlaks määratud pahaloomulise soliidkasvaja piires. KB-sse pole lisatud eelsoodumusi või seoseid vähiriskiga.
- Järgmises tabelis on esitatud nukleotiidimuutused kolme RET-variandi puhul, mida analüüs ei suuda tuvastada. Sama aminohappe muutuse puhul saab tuvastada ka teisi nukleotiidimuutusi.

Tabel 3 Nukleotiidi muudatused kolme RET variandi puhul

Aminohappe muutus	Chr*	Asend	Referentsalleel	Alternatiiv
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCGACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG
				TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA
				CAAAGAGA
				CAAAAAGG
				CCAAAAGG
				CTAAGAGG

* Chr = kromosoom

Toote komponendid

TSO Comprehensive (EU) test koosneb järgmistest komponentidest:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) komplekt (Illumina kataloog nr 20063092) – komplekt sisaldab piisava mahuga reaktiive 24 DNA ja 24 RNA teegi loomiseks. See maht hõlmab patsiendi proove ja kontrole. Eraldi müüdavad kontrollid (vt [Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad reaktiivid leheküljel 17](#)).
- Teadmiste baas: Uuendatud regulaarselt ja allalaadimiseks saadaval Illumina Lighthouse Portalis.
- Tarkvara Local Run Manager analüüsimoodul TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illumina kataloog nr 20051843), mis sisaldab järgmisi komponente:
 - TSO Comprehensive Nõudepakid
 - TSO Comprehensive Tarkvarakomplekt
 - TSO Comprehensive USB-komplekt

Illumina hooldusesindaja paigaldab Analüüsimoodul TSO Comprehensive (EU) sobiva versiooni Local Run ManagerNextSeq 550Dx Instrument. Teavet analüüsimooduli kohta vt Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoo juhend (dokument nr 200008661).

Reaktiivid

Komplekti kuuluvad reaktiivid

TSO Comprehensive (EU) analüüsikomplekt sisaldab järgmisi reaktiive.

TruSight Oncology RNA teegivalmistuskomplekt, osa nr 20031127

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli ja nukleotiide	-25 °C kuni -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli, DNA polümeraasi, RNAas H-d ja nukleotiide	-25 °C kuni -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli ja juhuslikke heksameere	-25 °C kuni -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pöördtranskriptaasi	-25 °C kuni -15 °C

Teegivalmistuskomplekt TruSight Oncology (hoida külmutatuna), osa nr 20031118

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab T4 DNA polümeraasi ja polünukleotiidi kinaasi	-25 °C kuni -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli ja nukleotiide	-25 °C kuni -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli	-25 °C kuni -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab ligaasi	-25 °C kuni -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab universaalseid sekveneermise oligonukleotiide	-25 °C kuni -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab universaalseid sekveneermise oligonukleotiide	-25 °C kuni -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli	-25 °C kuni -15 °C

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab DNA polümeraasi ja nukleotiide	-25 °C kuni -15 °C

Teegivalmistuskomplekt TruSight Oncology (hoida külmas), osa nr 20031119

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli	2 °C kuni 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vesilahus, mis sisaldab magnetkerakesi	2 °C kuni 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	EDTA tris-lahus	2 °C kuni 8 °C

Indekspraimerid TruSight Oncology Comp UP Index Primers, osa nr 20031120

Toimeained: Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab eraldi vöotkoodidega oligonukleotiidide praimereid.

**ETTEVAATUST!**

Kasutage indekspraimereid Unique Index Primer (UPxx) ainult RNA- või DNA -proovide puhul. Ärge kasutage samas teegis korraga indekspraimereid CPxx ja UPxx.

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

Indekspraimerid TruSight Oncology Comp CP Index Primers, osa nr 20031126

Toimeained: Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab eraldi vöökoodidega oligonukleotiidide praimereid.

**ETTEVAATUST!**

Kasutage indekspraimereid Combinatorial Index Primer (CPxx) ainult DNA proovide puhul. Ärge kasutage samas teegis korraga indekspraimereid CPxx ja UPxx.

Indekspraimer	Osa number	Kogus	Maht	i7 indeks	Järjestus	i5 indeks	Järjestus	Säilitustemperatuur
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C kuni -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C kuni -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C kuni -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C kuni -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C kuni -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C kuni -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C kuni -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C kuni -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C kuni -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C kuni -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C kuni -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C kuni -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C kuni -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C kuni -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C kuni -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C kuni -15 °C

Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), osa nr 20031123

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab formamiidi ja sooli	2 °C kuni 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli ja streptavidiiniga kovalentselt kaetud tahke faasi paramagnetilisi kerakesi	2 °C kuni 8 °C

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Naatriumhüdroksiidi lahus	2 °C kuni 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Puhverdatud vesilahus	2 °C kuni 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab tahke faasi paramagnetilisi kerakesi	2 °C kuni 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNBW1)	20031482	2	4,8 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli, 2-merkaptotetanooli ja formamiidi	2 °C kuni 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli	2 °C kuni 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli	2 °C kuni 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vesilahus, mis sisaldab magnetkerakesi	2 °C kuni 8 °C

Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (hoida külmutatuna), osa nr 20031121

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab oligonukleotiide	-25 °C kuni -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli	-25 °C kuni -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pesuainet	-25 °C kuni -15 °C

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab DNA polümeraasi ja nukleotiide	-25 °C kuni -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab P5 ja P7 praimereid	-25 °C kuni -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab sooli, 2-merkaptotoetanooli ja formamiidi	-25 °C kuni -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 või PhiX)	20031492	1	10 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab PhiX-i geneetilist DNA-d	-25 °C kuni -15 °C

Sisu komplekt TruSight Oncology Comp Content Set, osa nr 20031122

Reaktiiv	Osa number	Kogus	Maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotiidide sondikogum	-25 °C kuni -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotiidide sondikogum	-25 °C kuni -15 °C

Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad reaktiivid

Amplifitseerimiseelsed reaktiivid

- DNA ja RNA ekstraheerimise ja puhastamise reaktiivid – reaktiivinõudeid vt jaotisest [Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine leheküljel 27](#).
- DNA ja RNA kvantifitseerimisreaktiivid – reaktiivinõudeid vt jaotisest [Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine leheküljel 27](#).
- TruSight Oncology kontrollmaterjalid:
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina kataloogi nr 20065041)
 - TruSight Oncology RNA Control (Illumina kataloogi nr 20065042)
- 100% etanool (EtOH, 200 kraadi), molekulaarbioloogilisel tasemel

- RNAasi-/DNAasivaba vesi

Amplifitseerimisjärgsed reaktiivid

- Läbivoolureaktiivi komplekt NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 tsüklit), (Illumina kataloogi nr 20028871)
 - Läbivooluküvett NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 tsüklit)
 - Läbivoolureaktiivi kassett NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 tsüklit)
 - Puhvrikassett NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 tsüklit)
- 100% etanool (200 kraadi), molekulaarbioloogilisel tasemel
- RNAasi-/DNAasivaba vesi

Reaktiivide säilitamine ja käsitlemine

Järgmised reaktiivikarbid tarnitakse külmutatuna. Säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C.

Karp	Osa number	Labori ala
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Amplifitseerimiseelne
TruSight Oncology Comp Library Prep (hoida külmutatuna)	20031118	Amplifitseerimiseelne
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Amplifitseerimiseelne
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Amplifitseerimiseelne
TruSight Oncology Comp Enrichment (hoida külmutatuna)	20031121	Amplifitseerimisjärgne
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Amplifitseerimisjärgne



ETTEVAATUST!

Ärge hoiustage reaktiive jää-vabas külmikus ega külmiku ukseahthlites.

Järgmised reaktiivikarbid tarnitakse geelipakkidel, et hoida temperatuuri 0 °C kuni 10 °C. Säilitage temperatuuril 2 °C kuni 8 °C.

Karp	Osa number	Labori ala
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Amplifitseerimiseelne
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Amplifitseerimisjärgne



ETTEVAATUST!

Ärge külmutage kerakesi (LNB1, SPB ja SMB) sisaldavaid reaktiive.

- Muutused reagentide välimuses võivad tähendada, et materjalide seisukord on halvenenud. Välimuse füüsilise muutuse korral (nt reaktiivi värvimuutused või hägusus) ärge reaktiive kasutage.
- FSM, SSM, ERA1-B ja TCB1 võivad sisaldada tootega seotud osakesi. Järgige iga reaktiivi konkreetseid käsitlemisjuhiseid. Pärast FSM-i ja SSM-i segamisetappide tegemist ei mõjuta ülejäänud valged tootega seotud tahked osakesed toimivust.
- TSO Comprehensive (EU) analüüsi stabiilsust on hinnatud ja toimivust kinnitatud komplekti kuni nelja kasutuskorra jaoks. Reaktiivid on stabiilsed kuni komplekti etikettidel märgitud aegumiskuupäevani.

Seadmed ja materjalid

Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad seadmed ja materjalid

Amplifitseerimiseelsed seadmed ja materjalid

Seadmed	Tarnija
Ultrahelivann juurdekuuluvate lisatarvikutega Vt jaotist Ultraheliatori konfiguratsiooni sätteid DNA fragmenteerimiseks leheküljel 23 .	Üldine laboritarnija
Termotsükler järgmiste spetsifikatsioonidega: • Soojendusega kaas, mida on võimalik seadistada temperatuuridele 30 °C ja 100 °C (või välja lülitada, kui 30 °C pole võimalik) • Temperatuurivahemik 4 °C kuni 99 °C • Temperatuuri täpsus ±0,25 °C • Ühildub 96 süvendiga PCR-plaatidega, 0,2 ml • Vt Termotsükleri rambikiirus leheküljel 24	Üldine laboritarnija

Seadmed	Tarnija
Keerissegur	Tavapärane laboritarvete tarnija
Insertidega mikroproovide inkubaatorid (2) 96 süvendiga MIDI-plaatide jaoks (2)	Tavapärane laboritarvete tarnija
Mikrotsentrifuug	Üldine laboritarnija
Plaadi tsentrifuug järgmiste tehniliste andmetega: - Ühildub 96 süvendiga mikroplaatidega - Võimalik on 280 × g (+/- 10%)	Üldine laboritarnija
Plaadi raputi järgmiste tehniliste andmetega: 2 mm orbiit - Loksutusvõime 1200 p/min ja 1800 p/min	Tavapärane laboritarvete tarnija
Tihenduskiil või -rull	Tavapärane laboritarvete tarnija
Magnetalus järgmiste spetsifikatsioonidega: - Mõeldud paramagnetiliste kerakeste sadestamiseks/eraldamiseks - Magnetid asuvad aluse küljel (mitte põhjal) - Ühildub 96 süvendiga MIDI-plaatidega	Üldine laboritarnija
Täpsuspipetid, mis suudavad mahud vahemikus 2 µl kuni 1000 µl täpselt edastada järgmiste spetsifikatsioonidega: - Ühe- või mitmekanaliline pipett kasvuga 0,02 µl - Ühe- või mitmekanaliline pipett kasvuga 0,1 µl, 0,2 µl või 0,5 µl - Ühe- või mitmekanaliline pipett kasvuga 1 µl või 2 µl Pipetid peavad olema regulaarselt kalibreeritud ja täpsed 5% ulatuses märgitud mahust.	Üldine laboritarnija
Automaatpipettija	Üldine laboritarnija
Jää- või külmaplokk	Üldine laboritarnija
10 ml seroloogilised pipetid	Tavapärane laboritarvete tarnija
Adhesiivtihendid 96 süvendiga plaatidele järgmiste spetsifikatsioonidega: - Kooritav - Sobivad äärikuga või pooläärikuga PCR-plaatidele - Tugev adhesiiv, mis talub mitut temperatuurimuutust vahemikus -20 °C kuni 100 °C - DNaasi-/RNAasivaba	Üldine laboritarnija
1,7 ml mikrotsentrifuugi katsutid, nukleaasivabad	Üldine laboritarnija

Seadmed	Tarnija
Nukleasivabad reaktiivimahutid (ühekordselt kasutatav vann, 50 ml) (või samaväärne)	Üldine laboritarnija
15 ml koonilised katsutid	Tavapärane laboritarvete tarnija
50 ml koonilised katsutid	Üldine laboritarnija
Sobivad aerosoolikindlad pipetiotsakud	Üldine laboritarnija
96 süvendiga hoiuplaadid, 0,8 ml (MIDI-plaadid)	Fisher Scientific, osa nr AB-0859 või samaväärne
96 süvendiga PCR-plaadid, mis ühilduvad termotsükleriga, 0,2 ml (polüpropüleenist süvendid)	Üldine laboritarnija

Amplifitseerimisjärgsed seadmed ja materjalid

Seadmed	Tarnija
NextSeq 550Dx Seade	Illumina, kataloogi nr 20005715
Plaadi tsentrifuug järgmiste tehniliste andmetega: - Ühildub 96 süvendiga mikroplaatidega - Võimalik on 280 × g (+/- 10%)	Üldine laboritarnija
Termotsükler järgmiste spetsifikatsioonidega: - Soojendusega kaas (100 °C) - Temperatuurivahemik 4 °C kuni 99 °C - Temperatuuri täpsus ±0,25 °C - Ühildub 96 süvendiga PCR-plaatidega, 0,2 ml - Vt Termotsükleri rambikiirus leheküljel 24	Üldine laboritarnija
Keerissegur	Tavapärane laboritarvete tarnija
Mikroproovide inkubaator koos vahedetailiga 96 süvendiga MIDI-plaatide jaoks	Tavapärane laboritarvete tarnija
Kuivsoojendusplokk järgmiste spetsifikatsioonidega: - Temperatuurivahemik 25 °C kuni 99 °C - Temperatuuri täpsus ±5 °C - Veenduge, et mikrotsentrifuugi torud ühilduvad kuumutusplokkiga	Üldine laboritarnija
Plaadi raputi järgmiste tehniliste andmetega: 2 mm orbiit - Loksutusvõime 1200 p/min ja 1800 p/min	Tavapärane laboritarvete tarnija

Seadmed	Tarnija
Mikrotsentrifuug	Tavapärane laboritarvete tarnija
Tihenduskiil või -rull	Tavapärane laboritarvete tarnija
Magnetalus järgmiste spetsifikatsioonidega: • Mõeldud paramagnetiliste kerakeste sadestamiseks/eraldamiseks • Magnetid asuvad aluse küljel (mitte põhjal) • Ühildub 96 süvendiga MIDI-plaatidega	Üldine laboritarnija
Täpsuspipetid, mis suudavad mahud vahemikus 2 µl kuni 1000 µl täpselt edastada järgmiste spetsifikatsioonidega: • Ühe- või mitmekanaliline pipett kasvuga 0,02 µl • Ühe- või mitmekanaliline pipett kasvuga 0,1 µl, 0,2 µl või 0,5 µl • Ühe- või mitmekanaliline pipett kasvuga 1 µl või 2 µl Pipetid peavad olema regulaarselt kalibreeritud ja täpsed 5% ulatuses märgitud mahust.	Üldine laboritarnija
Automaatpipettija	Tavapärane laboritarvete tarnija
10 ml seroloogilised pipetid	Tavapärane laboritarvete tarnija
Adhesiivtihendid 96 süvendiga plaatidele järgmiste spetsifikatsioonidega: • Kooritav • Sobivad äärikuga või pooläärikuga PCR-plaatidele • Tugev adhesiiv, mis talub mitut temperatuurimuutust vahemikus -20 °C kuni 100 °C • DNAasi-/RNAasivaba	Üldine laboritarnija
Mikrotsentrifuugi katsutid mahuga 2 ml, nukleaasivabad	Üldine laboritarnija
1,7 ml mikrotsentrifuugi katsutid, nukleaasivabad	Üldine laboritarnija
Nukleaasivabad reaktiivimahutid (ühekordselt kasutatav vann, 50 ml) (või samaväärne)	Üldine laboritarnija
15 ml koonilised katsutid	Tavapärane laboritarvete tarnija
50 ml koonilised katsutid	Üldine laboritarnija
Sobivad aerosoolikindlad pipetiotsakud	Üldine laboritarnija

Seadmed	Tarnija
96 süvendiga hoiuplaadid, 0,8 ml (MIDI-plaadid)	Fisher Scientific, osa nr AB-0859 või samaväärne
96 süvendiga PCR-plaadid, mis ühilduvad termotsükleriga, 0,2 ml (polüpropüleenist süvendid)	Üldine laboritarnija
Jää- või külmaplokk	Üldine laboritarnija

Ultraheliatori konfiguratsiooni sätted DNA fragmenteerimiseks

DNA fragmentimine või lõikamine mõjutab analüüsi toimivust, määrates fragmendi suuruse jaotuse, mis omakorda mõjutab sekveneerimise katvust. TSO Comprehensive (EU) analüüsi jaoks hinnati ja optimeeriti mitut spetsiaalset ultraheliaparaadi konfiguratsiooni ([Tabel 4](#)).

- Lõikamisaega reguleeriti, et maksimeerida jaotises *Kvaliteedikontroll leheküljel 79* kirjeldatud mõõdikut MEDIAN_EXON_COVERAGE. Lõikamisajad (vt [Tabel 4](#)) erinesid konfiguratsioonide lõikes, samuti mõõdiku MEDIAN_INSERT_SIZE tulemused.
- Konfiguratsioone 1–4 ja 6 testiti 8-ribaliste klaaskatsutitega. Konfiguratsioon 5 kasutas ühte klaaskatsutit. Katsuti maht/mahud on toodud [Tabel 4](#).
- Konfiguratsioonide 3–6 optimeerimine (väiksemad veevanni mahud) kasutas pulseerimist.
- Konfiguratsioonid 3–5 kärbiti väiksemates mahukatsutites. Katsuti maht/mahud mõjutavad kärpimisparameetreid.
- Konfiguratsioon 4 (liiniandur, keskmise suurusega veevanni maht, degaseeritud vesi) vajab pikka impulsi viivituse aega (40 sekundit), et saavutada sarnane MEDIAN_EXON_COVERAGE võrreldes konfiguratsiooniga 1 ja 2 nimisisendmahul 40 ng.
- Optimaalsed seadistused konfiguratsiooniks 3 andsid veidi suurema fragmendi jaotuse võrreldes teiste konfiguratsioonidega (MEDIAN_INSERT_SIZE oli ligikaudu 5–10 aluspaari võrra suurem).
- Konfiguratsioon 3 ja 5 kasutas gaasita vett ja väikseimat veevanni mahtu.
- Peale selle vajab konfiguratsioon 3 ja 5 suurendatud DNA sisendmahtu (50 ng konfiguratsioonile 3, 60 ng konfiguratsioonile 5), et saavutada sarnane MEDIAN_EXON_COVERAGE kui ülejäänud nelja konfiguratsiooni puhul, milles kasutati nimisisendmahuna 40 ng.
- Konfiguratsioonil 3 ja 5 esines rohkem kahjustusi ja/või denaturatsiooni, mistõttu see vähendas teegi valmistamiseks kasutatavate dsDNA molekulide efektiivmassi.

Tsentrifuugige lõikamiskatsuteid, et tagada ettenähtud mahu saamine, kuna igasugune materjalikadu võib toimivust vähendada.

Tabel 4 Hinnatud spetsiifilised ultraheliaparaadi konfiguratsioonid

Parameeter	Konfiguratsioon					
	1	2	3	4	5	6
Andur	Liin	Punkt	Punkt	Liin	Punkt	Liin
Veevanni maht	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Degaseeritud vesi	Jah	Jah	Ei	Jah	Ei	Jah
Veejahuti	Jah	Jah	Jah	Jah	Jah	Jah
Veevanni temperatuur	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Tippvõimsus (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
Võimsustegur, %	30	10	30	25	20	25
Tsükleid impulsi kohta	200	200	1000	1000	1000	600
Pulseerimine (10 s impulsid)	Ei	Ei	Jah	Jah	Jah	Jah
Pulseeriv viivitusaeg	Ei kohaldu	Ei kohaldu	10 s	40 s	10 s	10 s
Lõikamisaeg	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Proovide töötlemine	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Partii suurus	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Klaasist 8-ribalise katsuti proovi suurus	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Üks katsuti (50 µl)	130 µl (või 96 mikrotUBE plaat)
Pseudotoonimine	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	3 mm Y 20 mm/s juures	Ei kohaldu	1,5 mm Y 10 mm/s juures
DNA sisendmahu ekvivalent (eksonite mediaankatvuseks)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ 200 s lõikamisaeg sisaldab 20 10-sekundilist impulssi.² 320 s lõikamisaeg sisaldab 32 10-sekundilist impulssi.

Termotsükleri rambikiirus

Termotsükleri rambikiirus mõjutab analüüsi kvaliteedikontrolli mõõdikuid (kasutatavad MSI kohad, sihtmärk-CNV bin-arvu mediaan, inserdi mediaansuurus (RNA)) samuti splaissvariantide ja fusioonide toetavaid

lugemeid. Termotsükleri rambikiirust on soovitatav optimeerida. Näiteks kohandati testitud mudelit vaikerambikiirusest (ja maksimaalsest) 5 °C/s kuni 3 °C/s, et saada võrreldavaid tulemusi teiste madalama vaikerambikiirusega mudelitega.

Proovimaterjalide kogumine, transportimine ja säilitamine

Järgige proovide kogumisel, transportimisel, säilitamisel ja töötlemisel standardprotseduure.

Nõuded proovile

FFPE kude

TSO Comprehensive (EU) analüüsi jaoks on vaja FFPE koest eraldatud 40 ng RNA-d ja/või 40 ng DNA-d. Nii RNA kui ka DNA kasutamine võimaldab analüüsida kõiki esitatud variandi tüüpe. Kude tuleb fikseerida formaliini sisaldava fikseerimisvahendiga, mis sobib molekulaaranalüüsiks (näiteks 10% neutraalpuhvril formaliin). Kude ei tohi olla dekaltsitseeritud. Enne TSO Comprehensive (EU) analüüsi tegemist peab patoloog koeproovi uurima, et veenduda selle analüüsiks sobivuses. Somaatiliste juhtmutatsioonide avastamiseks on vajalik vähemalt 20% kasvajasisaldus (pindalast). MSI oleku usaldusväärne tuvastamine mitmesuguste proovide puhul nõuab vähemalt 30% kasvajasisaldust. Kui proovi analüüsitakse vähem kui 30% kasvajasisaldusega, et määrata tulemusi teiste variantitüüpidega, võib MS-stabiilne tulemus olla ebausaldusväärne. MSI-kõrge tulemus on õige sõltumata kasvaja sisaldusest.

Geeniamplifikatsioonide ja RNA variantide puhul sõltub kasvajasisaldus amplifikatsiooni ulatusest või avaldumisest (vt jaotist [Kasvajasisaldus leheküljel 101](#)).

Suure tõenäosusega 40 ng RNA ja 40 ng DNA ekstraheerimiseks erinevatest tahke koe tüüpidest on soovitatav koemaht $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. See maht on võrdne kumulatiivse elujõulise koe pindalaga $\geq 200 \text{ mm}^2$, kasutades 5 μm paksusi lõike, või $\geq 100 \text{ mm}^2$, kasutades 10 μm paksusi lõike. Koe kumulatiivne pindala on elujõulise koe pindalade summa kõigis eraldamiseks esitatud lõikudes. Näiteks võib koe kumulatiivse pindala 200 mm^2 saada, eraldades neli 5 μm paksust lõiku, igaüks koepindalaga 50 mm^2 , või viis 10 μm paksust lõiku, igaüks koepindalaga 20 mm^2 . Koenekroos võib vähendada saadavate nukleiinhapete hulka. Valenegatiivsete tulemuste võimaluse minimeerimiseks võib koe makrodissekteerida, et saavutada soovitud elujõulise kasvaja sisaldus.

Nekrootilise koe suur hulk ($\geq 23\%$ pindala järgi) võib segada TSO Comprehensive (EU) analüüsi võimet avastada geeniamplifikatsioone ja RNA fusioone. Kui proovilõigud sisaldavad kogu koepiirkonnas rohkem kui 23% nekroosi, tuleb nekrootiline kude makrodissekteerida. Kui labor käitab analüüsiga RNA-d, tuleb lõikude hankimisel koeplokist vältida või minimeerida hemoglobiiniga kude. Vt [Segavad ained leheküljel 92](#).

Plaadile paigaldatud FFPE kude võib toatemperatuuril hoida kuni 28 päeva.

Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine

- Eraldage RNA ja DNA FFPE koeproovidest, kasutades müügilolevaid eraldamiskomplekte. Eraldamiskomplektide erinevused võivad mõjutada toimivust. Vt jaotist [Nukleiinhapete eraldamiskomplekti hindamine leheküljel 91](#).
- Ärge suurendage proteinaas K-d või samaväärset ensüümi eraldamise ajal eraldamiskomplektis oleva standardse kontsentratsiooni abil. Vt [Segavad ained leheküljel 92](#).
- Säilitage eraldatud nukleiinhapete varud eraldamiskomplekti tootja juhiste kohaselt.
- Säilitage ekstraheeritud DNA-d kuni 28 päeva temperatuuril -25 °C kuni -15 °C.
- Säilitage ekstraheeritud RNA-d kuni 28 päeva temperatuuril -85 °C kuni -65 °C.
- Kontsentratsioonimuutuste vältimiseks aja jooksul mõõtke DNA ja RNA 28 päeva jooksul alates teegi valmistamise alustamisest. Kvantifitseerige RNA ja DNA, kasutades fluoromeetrist kvantifitseerimismeetodit, mis kasutab nukleiinhapete sidumisvärve. Nukleiinhapete kontsentratsioon peab olema vähemalt kolme mõõtmise keskmine.
- Analüüsiks on vaja 40 ng igat RNAasi-/DNAasivabas vees (ei kuulu komplekti) valmistatud RNA-proovi lõpliku mahuga 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Analüüsiks on vaja 40 ng igat gDNA-proovi minimaalse eraldamiskontsentratsiooniga 3,33 ng/µl. Lõikamiseks on vaja lõppmahtu 52 µl (0,77 ng/µl), milles on lahjendina kasutatud vähemalt 40 µl TEB-d (kuulub komplekti).

Teekide säilitamine

Teeke saate säilitada nõrga sidemega PCR plaatidel 7 kuni 32 päeva olenevalt teegi tüübist (vt [Tabel 5](#)).

Tabel 5 Teekide säilitusajad

Teegi tüüp	Plate (Plaat)	Päevade arv	Säilitustemperatuur
cDNA	PCF-i PCR	≤ 7	-25 °C kuni -15 °C
Fragmenditud gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C kuni -15 °C
Rikastamiseelne	ALS-i PCR	≤ 30	-25 °C kuni -15 °C
Rikastamisjärgne	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C kuni -15 °C
Rikastamisjärgne PCR	PL-i PCR	≤ 30	-25 °C kuni -15 °C
Normaliseeritud	NL-i PCR	≤ 32	-25 °C kuni -15 °C

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

Ohutus



HOIATUS

See reaktiivide komplekt sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Ventilatsioon peab olema sobiv ohtlike materjalide käitlemiseks reaktiivides. Kandke kokkupuuteriskile vastavat kaitsevarustust, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel.

Täiendavat keskkonna-, tervise- ja ohutusteavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel support.illumina.com/sds.html.

- Käsitsege kõiki proovimaterjale nakkusohtlikena.
- Järgige labori ettevaatusabinõusid. Ärge pipeteerige suuga. Ärge sööge, jooge ega suitsetage töokeskkonnas. Proovide ja analüüsi reaktiivide käsitsemisel kandke ühekordseid kindaid ja laborikitleid. Pärast proovide ja analüüsi reaktiivide käsitsemist peske käed põhjalikult puhtaks.

Labor

- Saastumise vältimiseks korraldage laboris ühesuunaline töövoog. Amplifitseerimiseelses ja -järgses alas peavad olema spetsiaalsed seadmed ning materjalid (nt pipetid, pipetiotsakud, keerisegur ja tsentrifuug). Amplifitseerimisprodukti või sondi ülekandumise ärahoidmiseks vältige amplifitseerimisjärgsest alast amplifitseerimiseelsesse alasse naasmist.
- Tehke PCR-i indekseerimise ja rikastamise etapid amplifitseerimisjärgses alas, et vältida amplifitseerimisprodukti ülekandumist.
- Teekide valmistamise protseduurid nõuavad RNAasi-/DNAasivaba keskkonda. Dekontamineerige tööalad põhjalikult RNAasi-/DNAasivaba inhibeeriva puhastusvahendiga. Kasutage plasti, mis ei sisalda DNAasi, RNAasi ega inimese genoomi DNA-d.
- Amplifitseerimisjärgsetes protseduurides puhastage tööpinnad ja seadmed põhjalikult enne ning pärast igat protseduuri värskest valmistatud 0,5% naatriumhüpokloriti (NaOCl) lahusega. Laske lahusel pindadel toimida 10 minutit ja seejärel pühkige hoolikalt 70% etüül- või isopropüülalkoholiga niisutatud lapiga puhtaks.
- Kasutage nukleaasivabu mikrotsentrifuugi katsuteid, plaate, pipetiotsakuid ja mahuteid.
- Kasutage kogu analüüsi vältel kalibreeritud seadmeid. Kalibreerige seadmed kindlasti selles protokollis määratud kiiruste, temperatuuride ja mahtude järgi.
- Reaktiivi ja proovi täpseks doseerimiseks kasutage täppispipette. Kalibreerige regulaarselt vastavalt tootja spetsifikatsioonidele.
- Mitmekanaliliste pipettide kasutamisel järgige alltoodud suuniseid.

- Pipettige minimaalse mahuna $\geq 2 \mu\text{l}$.
- Veenduge, et kaitseotsakud sobituksid täpselt ning sobiksid mitmekanalilise pipeti kaubamärgi ja mudeliga.
- Kinnitage otsakud pöörleva liigutusega tagamaks, et kõik otsakud kinnituksid sama korralikult.
- Aspireerige 90° nurga all kõigisse otsakutesse sama vedelikumaht.
- Segage kõik komponendid pärast manustamist, pipettides reaktsioonisegu üles ja alla.
- Pärast väljutamist kontrollige, kas vedelik on kõigist otsakutest täielikult väljutatud.
- Kasutage kindlasti analüüsi jaoks õigeid seadmeid ja määrake programmid juhiste kohaselt.
- Termotsükleri ja mikroproovide inkubaatori puhul ettenähtud temperatuurid näitavad reaktsiooni temperatuuri, mitte tingimata seadme temperatuurisätet.

Analüüs

- Vältige ristsaastumist.
 - Järgige proovide ja reaktiivide käsitlemisel nõuetekohaseid laboritavasid.
 - Kasutage iga proovi jaoks ja iga reaktiivi väljutamise järel uusi laboritarvikuid ning pipetiotsakuid.
 - Ristsaastumise ohu vähendamiseks kasutage aerosoolikindlaid otsakuid.
 - Amplifitseerimisest etapist amplifitseerimisjärgsesse etappi liikumisel kasutage ühesuunalist töövoogu.
 - Käsitlemiseks avage korraga ainult üks indekspraimer. Sulgege kõik indeksikatsutid korgiga kohe pärast kasutamist. Komplekt sisaldab lisakorke.
 - Vahetage kindaid sageli ja igal juhul siis, kui need puutuvad kokku indekspraimerite või proovidega.
 - Eemaldage kasutamata indekspraimeri katsutid tööalast.
 - Ärge pange reaktiive pärast katsuti riba, vanni või mahutiga kasutamist varukatsutitesse tagasi.
 - Segage proove pipetiga ja tsentrifuugige plaati, kui juhistes on nii öeldud.
 - Kasutage mikroplaatide loksutit. Ärge segage plaate keerisseguril.
- Ärge kasutage analüüsikomponente teistest reaktiivikomplekti partiidest. Reaktiivikomplekti partiid on tuvastatavad reaktiivikomplekti karbi etiketi ja põhipartii lehe järgi.
- Nõuetekohased laboritavad on vajalikud, et vältida reaktiivide, seadmete, proovide ja teekide saastumist nukleasid ning PCR-i produktidega. Nukleasi ja PCR-i produktiga saastumine võib põhjustada ebatäpseid ning ebausaldusväärseid tulemusi.
- Analüüsi optimaalseks toimivuseks ja säilimiseks on nõutav õige plaaditüüp. Järgige kindlasti jaotises [Kasutusjuhised leheküljel 38](#) toodud juhiseid proovide ülekandmiseks plaatide vahel.
- Esitatud juhiste eiramine võib viia valetulemusteni või vähendada oluliselt teekide kvaliteeti.
- Kui jaotises [Kasutusjuhised leheküljel 38](#) pole peatumiskohta määratud, jätkake kohe järgmise etapiga.

- Säilitage analüüsi reaktiive või komponente amplifitseerimiseelses ja amplifitseerimisjärgses etapis ettenähtud temperatuuril.
- Ärge hoiustage reaktiive jäävabas külmikus ega külmiku uksestlites.
- Ärge külmutage kerakesi (LNB1, SPB ja SMB) sisaldavaid reaktiive.
- Ärge kasutage valesti säilitatud reaktiive.
- Ärge kalduge kõrvale iga reaktiivi puhul ettenähtud segamise ja käsitlemise protseduuridest. Reaktiivide ebapiisav segamine või liigne keerisseguril segamine võib põhjustada proovi tulemuste nurjumist.
- FSM, SSM, ERA1-B ja TCB1 võivad sisaldada tootega seotud osakesi. Järgige iga konkreetse reaktiivi käitlemisjuhiseid. Pärast FSM-i ja SSM-i segamisetappide tegemist ei mõjuta ülejäänud valged tootega seotud tahked osakesed toimivust.
- Valmistage värsked põhised ja kõrvaldage järelejäänud maht pärast kasutamist.
- Pesuetappideks valmistage alati värske 80% etanoolilahus RNAasi-/DNAasivaba veega. Etanool võib absorbeerida õhust vett ja seeläbi tulemusi mõjutada. Kõrvaldage 80% etanool pärast kasutamist vastavalt kohalikele, piirkondlikele ja/või riiklikele eeskirjadele.
- Kandke ettenähtud maht üle eluaati. Nõutust väiksema eluaadimahu ülekandmine elueerimisetappide ajal võib tulemusi mõjutada.
- Järgige ultraheliaparaatide puhul alltoodud soovitusi. Järgige kindlasti tootja juhiseid.
 - Sisestage gDNA ultraheliaparaadi katsutisse aeglaselt, et vältida mullide teket. Liigsed mullid või õhutasku lõikamiskatsutis võib põhjustada mittetäielikku fragmentimist.
 - Väljutage ultraheliaparaadi katsutitesse aeglaselt ja vältige pritsimist.
 - Vedeliku ülevoolamise ja proovi kao vältimiseks ärge sisestage fragmenditud DNA eemaldamisel pipetiotsakut ultraheliaparaadi katsuti põhja.
- Ärge pipettige proovi sisendmahuna vähem kui 2 µl.
- Etappides, kus igasse proovisüvendisse tuleb lisada vähem kui 10 µl materjali, ärge kasutage reaktiivi väljutamiseks vanni.
- Fragmenditud gDNA-proovide ülekandmisel ultraheliaparaadi katsutitest teegivalmistuse (LP) plaadile kasutage peene otsaga pipetti.
- Ärge kasutage korraga adaptereid SUA1 ja UMI.
- Adaptereid SUA1 kasutage RNA-proovidega.
- Adaptereid UMI kasutage DNA-proovidega.
- Määrake igale teegiproovile erinevad indekspraimerid, et iga teek kordumatult tuvastada, kui see on üksikus läbivooluküvetis sekveneerimiseks kogumisse lisatud.
- Ärge kasutage samas teegis indekspraimereid CPxx ja UPxx.

- Proovide ja indekspraimerite mittevastavus põhjustab tulemuste valesti esitamist positiivse proovi puuduliku identifitseerimise tõttu. Sisestage proovide ID-d ja määrake indeksid Local Run Manager analüüsimoodul TruSight Oncology Comprehensive (EU) enne teegi valmistamise alustamist. Märkige proovide ID-d, indeksid ja plaadi süvendite asetus üles teegi valmistamise viiteks.
- RNA-proovidest saadud teekide puhul kasutage ainult indeksid UPxx.
- DNA-proovidest saadud teekide puhul kasutage indeksid UPxx või CPxx.
- Sekveneeri iga läbivooluküveti kohta maksimaalselt 8 RNA teeki ja 8 DNA teeki. Sekveneeri vähemalt kolm teeki. Järgige suuniseid jaotises [Teekide arv ja indeksite valimine leheküljel 35](#).
- Pärast sidumisetappi toimingutes [Esimene sihtmärkide kinnistamine leheküljel 59](#) ja [Teine sihtmärkide kinnistamine leheküljel 63](#) jätkake kohe pesuetapiga, et vältida kerakesegraanulite kuivamist.
- Pesuetappides eemaldage 80% süvendite põhjas olevast etanoolist. On näidatud, et jääketanool mõjutab tulemusi.
- Analüüsi optimaalse toimivuse tagamiseks järgige jaotises [Kasutusjuhised leheküljel 38](#).
- Protseduuri [Teekide normaliseerimine leheküljel 70](#) (lk 1) ajal resuspendeerige teegi kerakesegraanul põhjalikult, et saavutada läbivooluküvetis klatri ühtlane tihedus.
- Teatage kohe kõigist selle tootega seotud tõsistest juhtumitest ettevõttele Illumina ning kasutaja ja patsiendi osariigi pädevale asutusele.

Protseduuriga seotud märkused

- TSO Comprehensive (EU) analüüsi töövoog saab läbi viia järgmise ajakava kohaselt:
 - 1. päev: cDNA süntees RNA-proovidest, DNA fragmentimine gDNA-proovidest, teekide valmistamine ja üleöö (esimese) hübriidsatsiooni alustamine.
 - 2. päev: rikastamine, rikastatud teekide normaliseerimine ja teekide sisestamine seadmesse NextSeq 550Dx Instrument.Kui TSO Comprehensive (EU) analüüsi töövoogu pole võimalik selle ajakava kohaselt läbi viia, on selle jaoks määratud kogu protokollis jooksul mitu ohutut peatumiskohta. Kui protokollis pole peatumiskohta määratud, jätkake kohe järgmise etapiga.
- RNA- ja DNA-proovidest saadud teegid saab valmistada samaaegselt eraldi süvenditesse.
- Põhisegu valmistamise tabelid sisaldavad mahu ülejääki tagamaks, et töödeldavate proovide hulga jaoks oleks piisavalt mahtu.
- Kasutage nukleaasivaba molekulaarselt puhast vett.
- Pärast reaktiivi lisamist loputage otsakut, aspireerides ja väljutades üks kord plaadi sobivasse süvendisse, välja arvatud juhul, kui protseduuris on teisiti määratud.
- Toatemperatuur tähendab temperatuurivahemikku 15 °C kuni 30 °C.

- Reaktiivid, proovid ja teegid tuleb hoida kasutusjuhendi teatud etappidel külmas. See on määratletud kui jääl või samaväärsel hoidmine.

Termotsükleri programmid

- Programmeerige amplifitseerimiseelse ja amplifitseerimisjärgse termotsükleri programmid enne protokollikäivitamist.
- Veenduge, et PCR-plaadid sobituksid tihedalt termotsüklerisse.
- Kasutage termotsükleri tootja soovitatud plaate.

Plaadi sulgemine ja avamine

- Sulgege plaadid alati uue adhesiivse plaaditihendiga. Ärge kasutage tihendeid korduvalt.
- Plaadi sulgemiseks kinnitage adhesiivne kate kindlalt plaadile, kasutades tihenduskiilu või -rulli.
- Katke 96 süvendiga plaat alati uue adhesiivse plaaditihendiga, enne kui järgite protokollieetappe.
 - Plaadi loksutamise etapid
 - Tsentrifuugimise etapid
 - Termotsükleri etapid
 - Hübridisatsioonid
 - Pikaajaline säilitamine
- Veenduge, et servad ja süvendid oleksid suletud, et vähendada ristsaastumise ning aurustumise ohtu.
- Asetage plaat tasasele pinnale, seejärel eemaldage tihend aeglaselt.
- Kui märkate enne tihendi eemaldamist tihendil või plaadi süvendite seintel vedelikku või kondensaati, tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut.
- Kasutage adhesiivseid plaaditihendeid, mis toimivad temperatuurivahemikus –20 °C kuni 100 °C ning sobivad äärikuga või pooläärikuga PCR-plaatidele.

Seadmed

- Veenduge enne analüüsi alustamist, et laboripersonal oleks kursis tootja juhistega kõigi seadmete kasutamise ja hooldamise kohta.

Plaaditüübid ja proovide ülekandmised plaatide vahel

- Analüüsi optimaalseks toimivuseks ja säilimiseks on nõutav õige plaaditüüp.
- Mahtude ülekandmisel plaatide vahel kandke ettenähtud maht plaadi igast süvendist sihtplaadi vastavatesse süvenditesse.
- Proovide ülekandmisel katsutiga ribade või plaatide vahel võib kasutada mitmekanalilisi pipette.
- Järgige plaatide loksutamisel järgmisi suuniseid.

- Kasutage plaatide loksutamiseks plaadiloksutit. Ärge keeristage plaate.
- PCR-plaate loksutage kiirusel 1200 p/min.
- MIDI-plaate loksutage kiirusel 1800 p/min.
- Järgige tootja juhiseid tagamaks, et plaadiloksuti hoiab plaati kindlalt.

Tsentrifugimine

- Kui protokoll juhiste kohaselt tuleb tsentrifugida lühidalt, tsentrifugige $280 \times g$ juures 1 minut.
- Kui märkate süvendi külgedel või tihendil vedelikku, tsentrifugige plaati $280 \times g$ juures 1 minut.

Reagentide käsitlemine

- Sulgege kõik reaktiivikatsutid pärast kasutamist tihedalt korgiga, et piirata aurustumist ja vältida saastumist.
- Viige reaktiivid tagasi määratud hoiutemperatuurile, kui neid pole enam protseduuri jaoks vaja.
- Järgige reaktiivi ettevalmistamise juhiseid, mis eelnevad jaotises [Kasutusjuhised leheküljel 38](#).
- Valmistage töödeldavate proovide arvu jaoks kindlasti ette vajalik maht põhiseгу, elueerimisegu ja 80% etanooli.
- Põhiseгу ja lahuste tabelis toodud mahud sisaldavad mahu ülejääki. Mahu ülejäägid arvutatakse järgmiselt.
 - [Tabel 14](#)
 - FSM-i maht = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{proovide} + \text{kontrollmaterjalide arv}) \times (1,25)$.
 - RVT maht = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{proovide} + \text{kontrollmaterjalide arv}) \times (1,25)$.
 - [Tabel 21](#)
 - ERA1-B maht = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (1,20)$.
 - ERA1-A maht = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (1,20)$.
 - [Tabel 29](#)
 - EE2 maht = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (1,364)$.
 - HP3 maht = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (1,364)$.
 - [Tabel 30](#)
 - EE2 maht = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (1,364)$.
 - HP3 maht = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (1,364)$.
 - [Tabel 36](#)
 - LNA1 maht = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (2,0)$.
 - LNB1 maht = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (2,0)$.
 - [Tabel 37](#)
 - EE2 maht = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (1,25)$.
 - HP3 maht = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{teekide arv}) \times (1,25)$.

Adapterikomplektid

- TSO Comprehensive (EU) analüüs sisaldab adaptereid SUA1 ja UMI.
- Adaptereid SUA1 kasutage RNA-proovidega. Ei ole mõeldud DNA-proovidega kasutamiseks.
- Adapterid UMI on mõeldud kasutamiseks DNA-proovidega. Ei ole mõeldud kasutamiseks RNA-proovidega.

Kerakeste käsitlemine

- TSO Comprehensive (EU) analüüs sisaldab kolme tüüpi kerakesi (SPB, SMB ja LNB1). Veenduge, et kasutaksite protseduuris õiget tüüpi kerakesi.
- Tehke iga kerakesetüübi puhul nõutud arv pesutsükleid.
- Veenduge enne kasutamist, et kerakesed oleksid toatemperatuuril.
- Homogeensuse tagamiseks segage kerakesi enne kasutamist 1 minut.
- Kerakeste segamisel pipetiga järgige järgmisi suuniseid:
 - Kasutage segatava mahu jaoks sobivat pipetti ja otsaku suurust.
 - Reguleerige mahusätteks ligikaudu 50–75% proovimahust.
 - Pipettige aeglaselt ilma kolbi vabastamata.
 - Vältige pritsimist ja mullide teket.
 - Asetage pipetiotsak graanuli kohale ja väljutage otse graanulisse, et vabastada kerakesed süvendist või katsutist.
 - Veenduge, et kerakestegraanul oleks täielikult lahuses. Lahus peab olema tumepruun ja homogeenne.
 - Hinnake, kas kerakestegraanul on olemas. Aspireerige ettevaatlikult otsakus oleva süvendi kogugraanulite lahus ja vaadake süvendite põhja.
- Kui kerakesed on magneteraldamise etappide käigus pipetiotsakutesse aspireeritud, väljutage kerakesed tagasi magnetalusel oleva plaadi süvendisse. Enne protseduuri järgmise etapiga jätkamist oodake, kuni vedelik on selge (umbes 2 minutit).
- Kerakeste pesemisel järgige alltoodud nõudeid:
 - Kasutage plaadi jaoks soovitatud magnetlust.
 - Väljutage vedelik otse kerakestegraanulile, nii et süvendi seintel olevad kerakesed oleksid märjad.
 - Hoidke plaati magnetalusel, kuni see tuleb protseduuri juhiste kohaselt eemaldada.
 - Ärge liigutage plaati magnetalusel.
 - Kui plaat on magnetalusel, ärge häirige kerakestegraanulit.
- Kerakeste pesemisel või supernatandi eemaldamisel seadke pipetiotsakud süvendite põhja nurga all, et vältida vaakumi teket ja lahuse tõmbamist pipetiotsakute filtrisse.

Teekide arv ja indeksite valimine

Enne käituse seadistamist kavandage sekveneerimiskäituse jaoks prooviteekide arv ja prooviindeksid.

Järgmised proovi numברי suunised hõlmavad positiivseid kontrollmaterjale, kuid mitte negatiivseid/matriitsita kontrollmaterjale (NTC). NTC-d tuleb kavandatavale käitusele lisada täiendava proovina.

TSO Comprehensive (EU) puhul järgige ühes läbivooluküvetis sekveneerimiseks vajalike RNA ja/või DNA teekide arvu määramisel Tabel 6 ja Tabel 7 toodud suuniseid. Kui sekveneerite RNA-d või DNA teeki eraldi, vaadake Tabel 6. Kui sekveneerite samas läbivoolurakus RNA ja DNA teeki, vaadake Tabel 7.

Tabel 6 RNA või DNA teekide sekveneerimine

Teegi tüüp	Minimaalne*	Maksimaalne*
Ainult RNA	3	16
Ainult DNA	3	8

* NTC-d ei aita kaasa plekssusele.

Tabel 7 RNA ja DNA teekide sekveneerimine samal läbivooluküvetil

Teegi tüüp	Minimaalne*	Maksimaalne*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC-d ei aita kaasa plekssusele.

Optimaalseks reaktiivi kasutamiseks DNA ja RNA teekide järjestamisel, kui TSO Comprehensive (EU) on NextSeq 550Dx Instrument, järjestage 8 RNA teeki ja 8 DNA teeki vooluküveti kohta.

Indekspraimerid identifitseerivad iga proovi üheselt, nii et teegid saab lisada ühes läbivooluküvetis sekveneerimiseks ühte kogumisse. Ühilduvad indeksikombinatsioonid kuvatakse Local Run Manager analüüsimoodul TruSight Oncology Comprehensive (EU) käituse seadistamise ajal kuval Create Run (Käituse loomine). Teegi valmistamise käigus lisage igale prooviteegile indekspraimer. *Kasutage iga prooviteegi puhul erinevat indekspraimerit segu.*

Veenduge, et proovidega kasutatavad indekspraimerid vastaksid Local Run Manager analüüsimoodul TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsiks valitud indeksitele. *Mittevastavus põhjustab tulemuste valesti esitamist positiivse proovi puuduliku identifitseerimise tõttu.*

TSO Comprehensive (EU) analüüs sisaldab kaht tüüpi indekseid.

- **UPxx-indeksid** – kasutage UPxx-indeksid RNA- või DNA-proovidest saadud teekide puhul.
- **CPxx-indeksid** – kasutage CPxx-indeksid DNA-proovidest saadud teekide puhul. Ärge kasutage CPxx-indeksid RNA-st saadud teekide puhul või kokku ainult kolme DNA teegi sekveneerimisel.

Ainult kolme teegi sekveneerimisel kehtivad järgmised nõudmised:

- Teegid peavad olema kõik DNA või kõik RNA teegid.
- Ärge kasutage CPxx-indeksikomplekte.
- Piisava mitmekülgsuse tagamiseks tuleb kasutada üht järgmistest UPxx-indeksikomplektidest:
 - UP01, UP02 ja UP03
 - UP04, UP05 ja UP06
 - UP07, UP08 ja UP09
 - UP10, UP11 ja UP12

Näiteks määratakse esimesele teegile indeks UP01, teisele teegile UP02 ja kolmandale teegile UP03.

TruSight Oncology kontrollmaterjalid

TSO Comprehensive (EU) vajab TruSight Oncology kontrollmaterjali, mis koosneb TruSight Oncology DNA kontrollist ja TruSight Oncology RNA kontrollist, kui positiivsetest kontrollidest. Kasutage kontrollmaterjali TruSight Oncology DNA Control iga DNA sekveneerimiskäituse jaoks ja kontrollmaterjali TruSight Oncology RNA Control iga RNA sekveneerimiskäituse jaoks asjaomase teegi valmistamisel (kaasake ka kontrollmaterjalid kombineeritud DNA ja RNA käituste jaoks). Iga kavandatud sekveneerimiskäituse jaoks tuleb valmistada kordumatu positiivne kontrollmaterjal. Lisateavet vt TruSight Oncology Controls pakendi infolehtelt (dokumendi nr 200009919).

Positiivse kontrollmaterjali sisendkogus on DNA ja RNA puhul 40 ng.

Kasutage asjakohast NTC-d iga RNA teegi ja iga DNA teegi valmistamisel. NTC-d sekveneeritakse ühe teegi valmistamise käigus korduvalt. Järgige TruSight Oncology kontrollmaterjalide puhul neid juhiseid:

- Valmistage teegid positiivsetest kontrollmaterjalidest ja matriitsita kontrollmaterjalidest identsetelt proovidega.
- Kasutage DNA NTC jaoks TEB-d.
- Kasutage RNA NTC jaoks DNAasi-/RNAasivaba vett.
- Positiivsed kontrollmaterjalid on kaasatud teegi maksimumnõudesse.
- NTC-d on kaasatud teegi miimumnõudesse.
- Ainult 3 teegi sekveneerimisel kasutage NTC puhul UP-indekseid.
- Kuna NTC-d sekveneeritakse korduvalt, ei saa selle kontrollmaterjali jaoks valitud indekseid teegi valmistamise käigus korrata.

Järgmistes tabelites on toodud plaadi paigutusnäited teegi valmistamiseks. Iga nummerdatud veerg tähistab üht sekveneerimiskäitust. DNA ja RNA teekide koos sekveneerimisel tähistab iga vastav veerukomplekt üht sekveneerimiskäitust (näiteks veerg 1 ja veerg 7). NTC sekveneeritakse iga veeru või veerukomplekti kohta.

Tabel 8 Ühe käituse, sh kuue patsiendiproovi teegi valmistamine

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pos. DNA kontrollmaterjal	tühi	tühi	tühi	tühi	tühi	Pos. RNA kontrollmaterjal
B	DNA 1	tühi	tühi	tühi	tühi	tühi	RNA 1
C	DNA 2	tühi	tühi	tühi	tühi	tühi	RNA 2
D	DNA 3	tühi	tühi	tühi	tühi	tühi	RNA 3
E	DNA 4	tühi	tühi	tühi	tühi	tühi	RNA 4
F	DNA 5	tühi	tühi	tühi	tühi	tühi	RNA 5
G	DNA 6	tühi	tühi	tühi	tühi	tühi	RNA 6
H	DNA NTC	tühi	tühi	tühi	tühi	tühi	RNA NTC

Tabel 9 Kolme käituse, sh 20 patsiendiproovi teegi valmistamine

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

Kasutusjuhised

TSO Comprehensive (EU) töövoog ülevaade on toodud [Joonis 1](#) ja [Joonis 2](#).

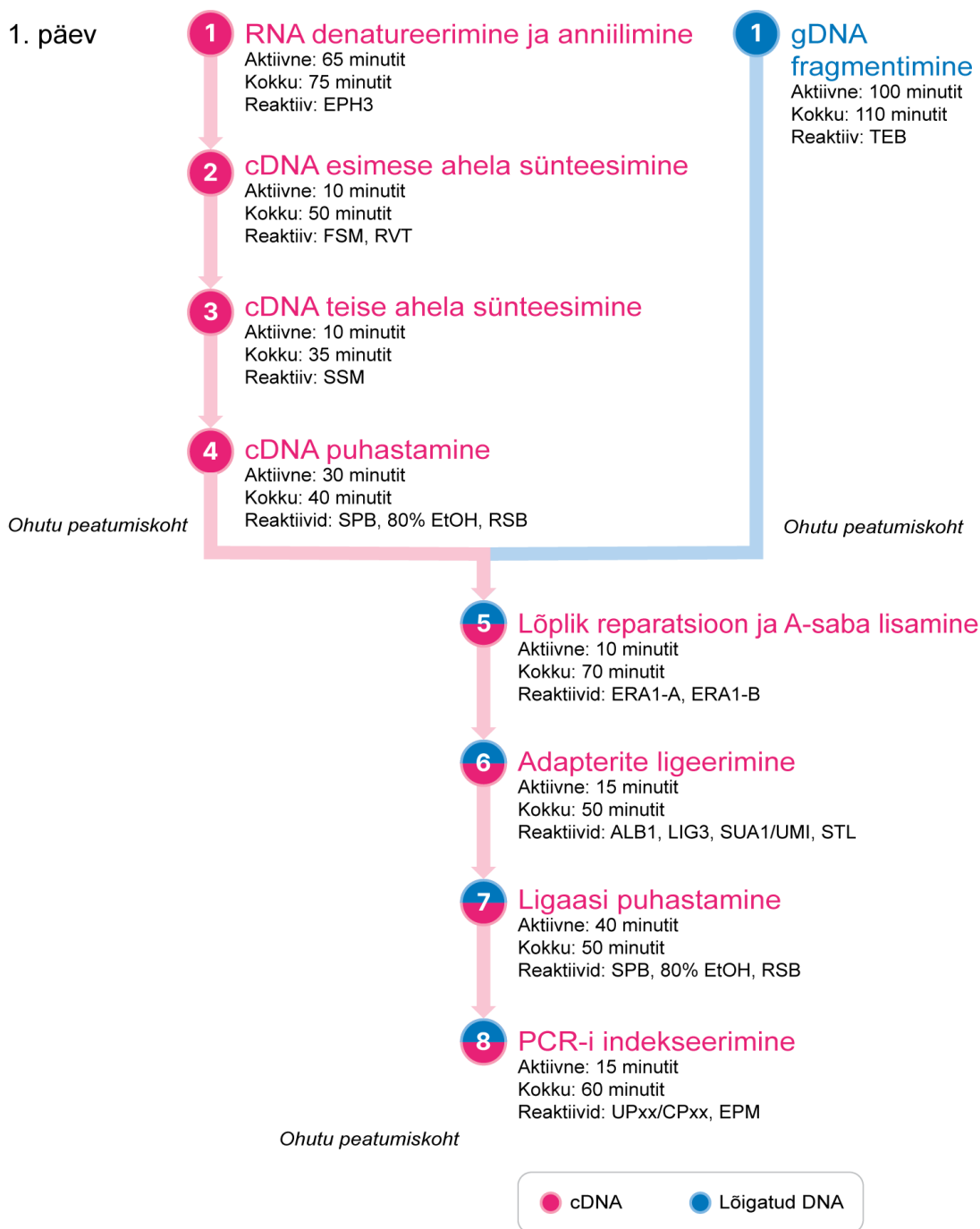
Teekide valmistamise töövoog

[Joonis 1](#) on kujutatud TSO Comprehensive (EU) analüüsi teegi ettevalmistamise töövoog. RNA- ja DNA-proovidest saadud teegid saab valmistada samaaegselt eraldi süvenditesse. Positiivseid kontrollmaterjale ja matriitsita kontrollmaterjale töödeldakse samamoodi kui proove. Etappide vahele on märgitud ohutud peatumiskohad.

Enne protokollide alustamist sisestage käituse ja proovi teave teave Local Run Manager analüüsimoodulisse TruSight Oncology Comprehensive (EU). Vt jaotist *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoog juhend (dokument nr 200008661)*.

Joonis 1 TSO Comprehensive (EU) Töövoog (1. osa)

1. päev

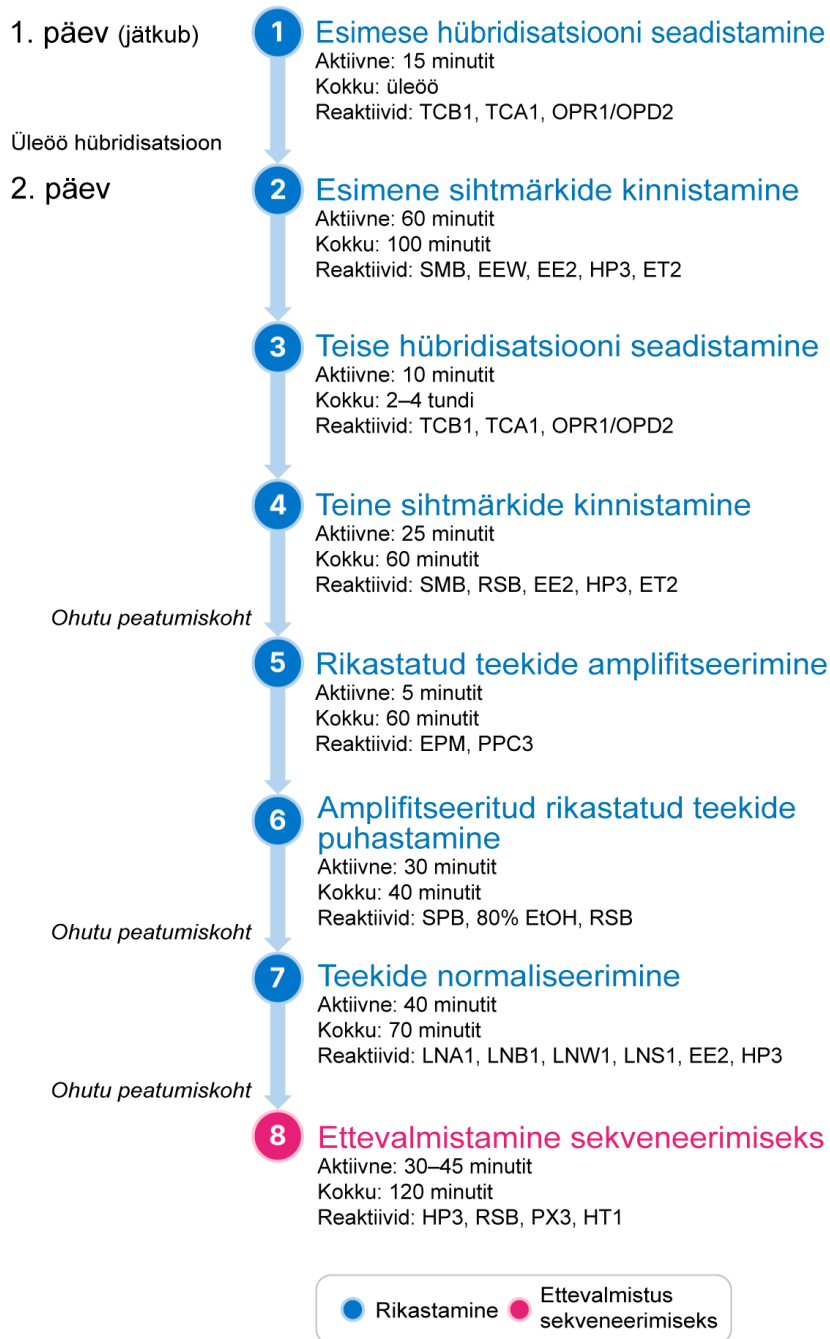


* Aktiivsed ja koguajad on ligikaudsed.

Rikastamise töövoog

Joonis 2 on kujutatud TSO Comprehensive (EU) rikastamise töövoog. Etappide vahele on märgitud ohutud peatumiskohad.

Joonis 2 TSO Comprehensive (EU) Töövoog (2. osa)



Termotsüklerite programmeerimine

Enne analüüsi alustamist salvestage amplifitseerimiseelsetesse ja -järgsetesse termotsükleritesse järgmised programmid.

Tabel 10 Amplifitseerimiseelse termotsükleri programmid

Protseduuri etapp	Programmi nimi	Kaane temperatuur	Reaktsioonimaht	Termotsükleri parameetrid
RNA denatureerimine ja anniilimine	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C 5 minutit • 4 °C 1 minut • Hoida temperatuuril 4 °C
cDNA esimese ahela sünteesimine	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C 10 minutit • 42 °C 15 minutit • 70 °C 15 minutit • 4 °C 1 minut • Hoida temperatuuril 4 °C
cDNA teise ahela sünteesimine	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C 25 minutit • 4 °C 1 minut • Hoida temperatuuril 4 °C

MÄRKUS Kui etapis 2ndSS ei saa kaane temperatuuriks seada 30 °C, lülitage eelsoojendusega kaane soojendusfunktsioon välja.

Tabel 11 Amplifitseerimisjärgse termotsükleri programmid

Protseduuri etapp	Programmi nimi	Kaane temperatuur	Reaktsioonimaht	Termotsükleri parameetrid
PCR-i indekseerimine	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C 30 sekundit • 15 tsükli: • 98 °C 10 sekundit • 60 °C 30 sekundit • 72 °C 30 sekundit • 72 °C 5 minutit • Hoida temperatuuril 10 °C
Esimene hübridiseerimine	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C 10 minutit • 85 °C 2 min 30 s • 75 °C 2 min 30 s • 65 °C 2 min 30 s • Hoida temperatuuril 57°C 8–24 tundi

Protseduuri etapp	Programmi nimi	Kaane temperatuur	Reaktsioonimaht	Termotsükleri parameetrid
Teine hübridiseerimine	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C 10 minutit • 85 °C 2 min 30 s • 75 °C 2 min 30 s • 65 °C 2 min 30 s • Hoida temperatuuril 57 °C 1,5–4 tundi
Rikastatud teekide amplifitseerimine	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C 30 s • 18 tsüklit: • 98 °C 10 s • 60 °C 30 s • 72 °C 30 s • 72 °C 5 min • Hoida temperatuuril 10 °C

Protokolliks valmistumine

See ettevalmistus on vajalik protokollide etappide tegemiseks, mis viivad järgmise ohutu peatumispunkti.



ETTEVAATUST!

Kõik töövoo protseduurid nõuavad RNAasi-/DNAasivaba keskkonda.

1. Dekontamineerige tööalad põhjalikult RNAasi/DNAasi inhibeeriva puhastusvahendiga.
2. Veenduge, et amplifitseerimiseelse termotsükleri programmid oleksid määratud. Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
3. Ultraheliaparaadi seadistamiseks järgige tootja juhiseid.
4. Ainult DNA-proovide töötlemisel jätkake otse toiminguga [gDNA fragmentimine leheküljel 48](#).
5. Võtke RNA kontrollmaterjalid hoiult.
6. Võtke reaktiivikatsutid karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 12 TruSight Oncology RNA teegivalmistuskomplekt (osa nr 20031127)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
EPH3	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	RNA denatureerimine ja anniilimine
FSM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	cDNA esimese ahela sünteesimine
RVT	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke külmas.	cDNA esimese ahela sünteesimine

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
SSM	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	cDNA teise ahela sünteesimine

Tabel 13 Teegivalmistuskomplekt TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (osa nr 20031119)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
SPB (helerohelise etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	cDNA puhastamine
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	cDNA puhastamine

RNA denatureerimine ja anniilimine

See protsess denatureerib puhastatud RNA ja praimib selle juhuslike heksameeridega cDNA sünteesi ettevalmistamiseks.

Ettevalmistamine

- Valmistage järgmised reaktiivid.
 - EPH3 – pange kõrvale.
 - FSM – keeristage segamiseks. Tsentrifuugige lühidalt ja seejärel pipettige segamiseks. Reaktiiv võib sisaldada valgeid tootega seotud osakesi. Kasutaja sekkumine ei ole vajalik. See ei mõjuta toote toimivust.
 - RVT – tsentrifuugige lühidalt ja seejärel pipettige segamiseks. Hoidke külmas.

MÄRKUS RVT on viskoosne lahus. Minimeerige mulli moodustumist pipettimise ajal.

- Ühendage mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud, et valmistada ette põhisegu FSM + RVT.

Tabel 14 FSM + RVT põhisegu*

Põhisegu komponent	4 teeki (µl)	8 teeki (µl)	16 teeki (µl)	24 teeki (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vt jaotisest [Reagentide käsitlemine leheküljel 33](#).

- Pipettige segamiseks 10 korda.
- Hoidke põhisegu FSM + RVT jääle kuni etapini [cDNA esimese ahela sünteesimine leheküljel 44](#).

Protseduur

1. Hoidke ekstraheeritud RNA proovid ja RNA kontrollid sulatamise ajal külmana. Protokollile ülejäänud osa puhul töödelge RNA kontrollmaterjale proovidenä.
2. Hoidke RNA külmana, kui seda ei kasutata. Teavet proovide kvantifitseerimise kohta vt jaotisest [Nõuded proovile leheküljel 26](#).
3. Pipettige iga RNA-proovi segamiseks 10 korda.
4. Valmistage RNAasi-/DNAasivaba vee abil 40 ng iga RNA-proovi lõpliku mahuga 8,5 µl (4,7 ng/µl). RNA kontrollmaterjalide puhul kasutage katsuti etiketil näidatud kontsentratsiooni.
5. Märkige uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga CF (cDNA fragmendid).
6. Lisage CF-i PCR-plaadi eraldi süvenditesse 8,5 µl iga RNA-proovi.
7. Veenduge, et prooviplaadi paigutus ja iga proovi indeksid vastaksid TSO Comprehensive (EU) analüüsimoodulis käituse seadistamise ajal kavandatud käitusele.
8. Keeristage EPH3 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
9. Lisage igasse proovisüvendisse 8,5 µl EPH3.
10. Pange CF-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.



ETTEVAATUST!

Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.

11. Loksutage 1 minut kiirusel 1200 p/min.
12. Tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut.
13. Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm LQ-RNA.
Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
14. Kui proovid jõuavad temperatuurini 4 °C, hoidke neid 1 minut. Jätkake kohe järgmise etapiga.

cDNA esimese ahela sünteetiline

See protsess pöördtranskribeerib juhuslike heksameeridega praimitud RNA fragmendid cDNA esimesse ahelasse, kasutades pöördtranskriptsiooni.

Protseduur

1. Eemaldage CF-i PCR-plaat termotsüklerist.
2. Pipettige 10 korda põhisegu FSM + RVT segamiseks. Veenduge, et FSM + RVT segu oleks täiesti homogeenne.
3. Lisage igasse proovisüvendisse 8 µl põhisegu FSM + RVT.
4. Pipettige segamiseks 10 korda.
5. Kõrvaldage ülejäänud põhisegu FSM + RVT.
6. Pange CF-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.

Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.

7. Loksutage 1 minut kiirusel 1200 p/min.
8. Tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut.
9. Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm 1stSS.
Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
10. Kui proovid jõuavad temperatuurile 4 °C, jätkake kohe järgmise etapiga.
Esimese ahela proove võib hoida temperatuuril 4 °C kuni 5 minutit.

cDNA teise ahela sünteesimine

See protsess eemaldab RNA-matriitsi ja sünteesib kaheahelalise cDNA.

Ettevalmistamine

1. Valmistage ette SSM:
 - a. Pöörake segamiseks 10 korda.
 - b. Tsentrifuugige lühidalt. Reaktiiv võib sisaldada valgeid tootega seotud osakesi. Sekkumine ei ole vajalik.
See ei mõjuta toote toimivust.

Protseduur

1. Eemaldage CF-i PCR-plaat termotsüklerist.
2. Lisage igasse proovisüvendisse 25 µl SSM-i.
3. Pange CF-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
4. Loksutage 1 minut kiirusel 1200 p/min.
5. Tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut.
6. Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm 2ndSS.
Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
7. Kui proovid jõuavad temperatuurile 4 °C, oodake 1 minut ja jätkake kohe järgmise etapiga.

cDNA puhastamine

See protsess kasutab cDNA puhastamiseks soovimatutest reaktsiooni komponentidest SPB-d. Kerakesi pestakse kaks korda värske 80% etanooliga. cDNA elueeritakse RSB-ga.

Ettevalmistamine

1. Valmistage järgmised reaktiivid.
 - SPB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.

- RSB – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
2. Valmistage 15 ml või 50 ml koonilisse katsutisse värske 80% EtOH nagu järgnevalt näidatud.

Tabel 15 Valmistage ette värske 80% EtOH

Reaktiiv	4 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki
100% EtOH, puhas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNAasi-/DNAasivaba vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Keeristage värsket 80% EtOH-d segamiseks.
4. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga BIND1 (cDNA sidumine).
5. Katke ja pange kõrvale.
6. Pange valmis magnet.

Protseduur

Sidumine

1. Eemaldage CF-i PCR-plaat termotsüklerist.
2. Keeristage SPB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
3. Lisage 90 µl SPB-d kohe igasse BIND1 MIDI-plaadi proovisüvendisse.
Kui kasutate SPB väljutamiseks vanni, arvestage proovi kohta piisava materjali alikvootimisel ülejäägiteguriga 1,15. Kui SPB on kõigisse proovisüvenditesse lisatud, kõrvaldage ülejäänud materjal.
4. Kandke iga proovi tervikmaht (50 µl) CF-i PCR-plaadilt BIND1 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
5. Kõrvaldage tühi CF-i PCR-plaat.
6. Pange BIND1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
7. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
8. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
9. Asetage BIND1 MIDI-plaat 5 minutiks magnetalusel.
10. Hoidke plaati magnetalusel. Eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti abil kõigist proovisüvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.

Pesemine

1. Peske kerakesi järgmiselt.
 - a. Hoidke BIND1 MIDI-plaati magnetalusel ja lisage igasse süvendisse 200 µl värsket 80% EtOH-d.
 - b. Oodake 30 sekundit.
 - c. Eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti abil kõigist proovisüvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.
2. Peske kerakesi **teist** korda.

3. Kasutage pipetti, et eemaldada ja visata ära igast süvendist järelejäänud EtOH.
4. Kõrvaldage kasutamata 80% EtOH.

Elueerimine

1. Eemaldage BIND1 MIDI-plaat magnetaluselt.
2. Pöörake või keeristage RSB-d segamiseks.
3. Lisage igasse proovisüvendisse 22 µl RSB-d.
4. Pange BIND1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
5. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
6. Inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril.
7. Asetage 2 minutiks magnetalusele.
8. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga PCF (Puhastatud cDNA fragmendid).
Kui peatute asendis [OHUTU PEATUMISKOHT](#) leheküljel 47, kasutage PCR-plaati.
9. Kandke 20 µl eluaati igast BIND1 MIDI-plaadi proovisüvendist PCF-plaadi vastavasse süvendisse.
10. Kõrvaldage tühi BIND1 MIDI-plaat.
11. Lisage 30 µl RSB-d igasse PCF-plaadi proovisüvendisse.
12. Pipettige segamiseks 10 korda.
13. Pange PCF-plaadile adhesiivne plaaditihend ja hoidke külmas.
14. Pange EPH3, FSM, RVT ja SSM tagasi hoiule.
15. Kui töötlete ainult RNA -st (cDNA)-st pärinevaid proove ja ei peatu ohutus peatumiskohas, jätkake jaotisega [Lõplik reparatsioon ja A-saba lisamine](#) leheküljel 51.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumisel tsentrifuugige PCF-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 7 päeva.

Protokolliks valmistumine

See ettevalmistus on vajalik protokollide etappide tegemiseks, mis viivad järgmise ohutu peatumispunkti.

1. Võtke DNA kontrollmaterjalid hoiult.
2. Võtke reaktiivikatsuti karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 16 Teegivalmistuskomplekt TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (osa nr 20031119)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
TEB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	gDNA fragmentimine

gDNA fragmentimine

See protsess fragmendib gDNA ja loob dsDNA fragmendid 3' või 5' üleulatustega.

Ettevalmistamine

1. Proovide kvantifitseerimiseks järgige kindlasti jaotise [Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine](#) leheküljel 27.
2. Valmistage ette TEB – pöörake või keeristage segamiseks.

Protseduur

Plaadi valmistamine

Valmistage plaat ette ühel järgmisest meetodist:

- Töödelge gDNA-proove samaaegselt cDNA-proovidega PCF-i MIDI-plaadil.
 - a. Märgistage PCF-i MIDI-plaat etiketiga LP (Teegi valmistamine).
 - b. Hoidke külmas ja pange kõrvale toimingus [Fragmenditud DNA ülekandmine](#) leheküljel 49 kasutamiseks.
- Töödelge gDNA-proove samaaegselt cDNA-proovidega, nii et PCF-i PCR-plaat on külmutatud.
 - a. Sulatage PCF-i PCR-plaat toatemperatuurile.
 - b. Tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minut.
 - c. Pipettige segamiseks 10 korda.
 - d. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga LP (Teegi valmistamine).
 - e. Kandke iga proovi tervikmaht (50 µl) PCF-i PCR-plaadilt LP MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
 - f. Kõrvaldage PCF-i PCR-plaat.
 - g. Pange peale adhesiivne plaaditihend ja hoidke külmas kuni toiminguni [Fragmenditud DNA ülekandmine](#) leheküljel 49.
- Töödelge ainult gDNA-proove.
 - a. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga LP (Teegi valmistamine).
Kui peatute asendis [OHUTU PEATUMISKOHT](#) leheküljel 49, kasutage PCR-plaati.
 - b. Katke ja pange kõrvale toimingus [Fragmenditud DNA ülekandmine](#) leheküljel 49 kasutamiseks.

gDNA lahjendamine

1. Sulatage gDNA-proovid ja DNA kontrollmaterjalid toatemperatuuril.
2. Pipettige igat gDNA-proovi segamiseks 10 korda.
3. Tsentrifugeerige katsutid lühidalt, et tilgad kokku koguda.
4. Pöörake või keeristage TEB-d segamiseks.

5. Kasutage TEB-d iga gDNA-proovi valmistamiseks lõpliku mahuga 52 µl. Teavet sisendkoguste ja minimaalsete kontsentratsioonide kohta vastavalt proovi tüübile vaadake järgmisest tabelist.
- Analüüsi jaoks on nõutav minimaalne ekstraheerimiskontsentratsioon, et võimaldada 52 µl mahust eraldada vähemalt 40 µl TEB-d.
 - DNA kontrollmaterjalide puhul kasutage katsuti etiketil näidatud kontsentratsiooni.
 - Proovi kao vältimiseks ärge pipettige sellesse lahusesse vähem kui 2 µl proovi.

Proovi tüüp	Sisendkogus (ng)	Minimaalne kontsentratsioon (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Control (Kontrollmaterjal)	40	Vt katsuti etiketti

Fragmentimine

1. Lisage 52 µl igat gDNA-proovi ultraheliaparaadi katsuti eraldi süvendisse.



ETTEVAATUST!

Sisestage gDNA katsutisse aeglaselt, jälgides, et katsuti põhjas ei oleks õhutaskuid. Lisateavet vt jaotisest [Analüüs leheküljel 29](#) ja tootja juhistest.

2. Märkige üles riba asend.
3. Fragmentige gDNA ultraheliaparaadi abil.

Fragmenditud DNA ülekandmine

1. Veenduge, et prooviplaadi paigutus ja indeksid sobiksid iga proovi puhul seeriaga, mille valite analüüsi jaoks TSO Comprehensive (EU) analüüsimoodulis.
2. Proovi kogumiseks järgige ultraheliaparaadi tootja juhiseid.
Mõne ultraheliaparaadi katsutitüübi puhul on proovi katsutis tihendamiseks vajalik tsentrifuugimine.
3. Kandke iga fragmenditud gDNA-proovi puhul peenotsakuga pipeti abil LP MIDI plaadi tühja süvendisse 3 korda 16,7 µl.
4. Pange LP MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumisel pange LP PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend ja tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut. Säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 7 päeva.

Protokolliks valmistumine

See ettevalmistus on vajalik protokolliga etappide tegemiseks, mis viivad järgmise ohutu peatumispunkti.

Veenduge, et amplifitseerimisjärgse termotsükleri programmid oleksid määratud. Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).

1. Valmistage ette jäämber või samaväärne.
2. Võtke reaktiivikatsutid karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 17 Teegivalmistuskomplekti TruSight Oncology Comp Library Prep (hoida külmutatuna) karp (osa nr 20031118)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
ERA1-A	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke külmas.	Lõplik reparatsioon ja A-saba lisamine
ERA1-B	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Lõplik reparatsioon ja A-saba lisamine
ALB1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Adapterite ligeerimine
LIG3	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke külmas.	Adapterite ligeerimine
SUA1 (sinise korgiga)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Adapterite ligeerimine
UMI (valge korgiga)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Adapterite ligeerimine
STL	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Adapterite ligeerimine
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke külmas.	PCR-i indekseerimine

Tabel 18 Teegivalmistuskomplekti TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) karp (osa nr 20031119)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
SPB (helerohelise etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	Ligaasi puhastamine
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Ligaasi puhastamine

Tabel 19 Indekspraimerite TruSight Oncology Comp UP Index Primers karp (osa nr 20031120)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
UPxx	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage sobivad indekspraimerid katsutid toatemperatuurile.	PCR-i indekseerimine

Tabel 20 Indekspraimerite TruSight Oncology Comp CP Index Primers karp (osa nr 20031126)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
CPxx	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage sobivad indekspraimeride katsutid toatemperatuurile.	PCR-i indekseerimine

Lõplik reparatsioon ja A-saba lisamine

See protsess reparaarib fragmentimise tagajärjel tekkinud üleulatused üleulatuva A-saba otstesse, kasutades põhisegu End Repair A-Tailing (ERA1).

Selle segu 3' kuni 5' eksonukleasne aktiivsus eemaldab 3' üleulatused ja 5' kuni 3' polümeraasne aktiivsus täidab 5' üleulatused. 3' otstele lisatakse selle reaktsiooni käigus A-saba, et vältida adapteri ligatsioonireaktsiooni ajal nende ligeerumist üksteise külge.

Ettevalmistamine

- Eelsoojendage kaht MIDI soojendusploki insertidega mikroproovide inkubaatorit järgmiselt.
 - Eelsoojendage mikroproovide inkubaator temperatuurini 30 °C.
 - Eelsoojendage mikroproovide inkubaator temperatuurini 72 °C.
- Valmistage järgmised reaktiivid.
 - ERA1-A – tsentrifuugige lühidalt ja seejärel pipettige segamiseks. Hoidke külmas.
 - ERA1-B – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt. Kontrollige võimaliku sademe suhtes. Sademe olemasolul soojendage katsuti temperatuurini 37 °C ja seejärel pipettige segamiseks, kuni sade lahustub.

- Valmistage mikrotsentrifuugi katsutis põhisegu ERA1.

Tabel 21 ERA1 põhisegu*

Põhisegu komponent	4 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
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

* See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vt jaotisest [Reagentide käsitlemine leheküljel 33](#).

- Homogeensuse tagamiseks pipettige aeglaselt 10 korda ja tsentrifuugige seejärel lühidalt. Hoidke ERA1 põhisegu külmas.
- Plaadi ettevalmistamiseks valige üks järgmistest meetoditest:
 - Kui proovid on MIDI-plaadil, valmistage neid ette järgmiselt.
 - Märgistage uuesti MIDI-plaat etiketiga LP2 (Teegi valmistamine 2).
 - Kui mõned proovid asuvad eraldi MIDI-plaatidel, viige kõik proovid sama MIDI-plaadi eraldi süvenditesse vastavalt plaadi paigutusele.

- Kui plaat on külmutatud, valmistage see ette järgmiselt.
 - a. Sulatage PCF-i PCR-plaat või LP PCR-plaat toatemperatuurile.
 - b. Tsentrifugeerige plaati 280 × g juures 1 minut.
 - c. Pipettige segamiseks 10 korda.
 - d. Märkige uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga LP2 (Teegi valmistamine 2).
 - e. Kandke iga proovi tervikmaht 50 µl PCF-i PCR-plaadilt või LP PCR-plaadilt LP2 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
 - f. Kõrvaldage PCF-i PCR-plaat või LP PCR-plaat

Protseduur

1. Lisage LP2 MIDI-plaadi igasse proovisüvendisse 10 µl põhisegu ERA1.
2. Kõrvaldage ülejäänud põhisegu ERA1.
3. Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
4. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
5. Inkubeerige eelsoojendatud mikroproovide inkubaatoris 30 minutit temperatuuril 30 °C.
6. Kandke kohe üle teise eelsoojendatud mikroproovide inkubaatorisse.
7. Inkubeerige 20 minutit temperatuuril 72 °C.
8. Hoidke LP2 MIDI-plaati 5 minutit külmas.

Adapterite ligeerimine

See protsess ligeerib adapterid cDNA ja/või gDNA fragmentide otstes.

Analüüs TSO Comprehensive (EU) sisaldab adaptereid SUA1 ja UMI.

- Adaptereid SUA1 kasutage RNA-proovidega.
- Adaptereid UMI kasutage DNA-proovidega.

Ettevalmistamine

1. Valmistage järgmised reaktiivid.
 - ALB1 – keeristage segamiseks vähemalt 10 sekundit ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
 - LIG3 – tsentrifugeerige lühidalt ja seejärel pipettige segamiseks. Hoidke külmas.
 - SUA1 – keeristage segamiseks vähemalt 10 sekundit ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
 - UMI – keeristage segamiseks vähemalt 10 sekundit ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
 - STL – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.

Protseduur

1. Eemaldage LP2 MIDI-plaat jäält või samaväärselt.
2. Lisage LP2 MIDI-plaadi igasse proovisüvendisse 60 µl ALB1-e. ALB1 on viskoosne lahus. Pipettige aeglaselt, et minimeerida mullide moodustumist.
3. Lisage igasse proovisüvendisse 5 µl LIG3.
4. Lisage adapterid järgmiselt.
Ärge kasutage korraga eri tüüpi adaptereid.
 - **[RNA-proovi süvendid]**—Lisage 10 µl SUA1 (sinise korgiga) igale RNA-st saadud proovile.
 - **[DNA-proovi süvendid]**—Lisage 10 µl UMI-d (valge korgiga) igale DNA-st saadud proovile.
5. Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
6. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
7. Inkubeerige 30 minutit toatemperatuuril.
8. Keeristage STL-i segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
9. Lisage LP2 MIDI-plaadi igasse proovisüvendisse 5 µl STL-i.
10. Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
11. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.

Ligaasi puhastamine

See protsess kasutab SPB-d adapteriga ligeeritud cDNA või gDNA fragmentide puhastamiseks ning eemaldab soovimatud produktid. Kerakesi pestakse kaks korda värske 80% etanooliga. Adapteriga ligeeritud proove elueeritakse RSB-ga.

Ettevalmistamine

1. Valmistage järgmised reaktiivid.
 - SPB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
 - RSB – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
2. Valmistage 15 ml või 50 ml koonilisse katsutisse värske 80% EtOH.

Tabel 22 Valmistage ette värske 80% etanool

Reaktiiv	4 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
100% EtOH, puhas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNAasi-/DNAasivaba vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Keeristage värsket 80% EtOH-d segamiseks.

4. Pange valmis magnet.

Protseduur

Sidumine

1. Keeristage SPB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
2. Lisage 112 µl SPB-d kohe igasse LP2 MIDI-plaadi proovisüvendisse.
Kui kasutate SPB väljutamiseks vanni, arvestage proovi kohta piisava materjali alikvootimisel ülejäägiteguriga 1,15. Kui SPB on kõigisse proovisüvenditesse lisatud, kõrvaldage ülejäänud materjal.
3. Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
4. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
5. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
6. Asetage LP2 MIDI-plaat 10 minutiks magnetilusele.
7. Eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti abil kõigist proovisüvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.

Pesemine

1. Peske kerakesi järgmiselt.
 - a. Hoidke LP2 MIDI-plaadi magnetilusel ja lisage igasse proovisüvendisse 200 µl värsket 80% EtOH-d.
 - b. Oodake 30 sekundit.
 - c. Eemaldage tasemele 200 µl seatud pipeti abil kõigist proovisüvenditest kogu supernatant, häirimata kerakestegraanulit, ning kõrvaldage see.
2. Peske kerakesi **teist** korda.
3. Kasutage pipetti, et eemaldada ja visata ära igast süvendist järelejäänud EtOH.
4. Kõrvaldage kasutamata 80% EtOH.

Elueerimine

1. Eemaldage LP2 MIDI-plaat magnetiluselt.
2. Pöörake või keeristage RSB-d segamiseks.
3. Lisage igasse proovisüvendisse 27,5 µl RSB-d.
4. Pange LP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
5. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
6. Inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril.
7. Asetage LP2 MIDI-plaat 2 minutiks magnetilusele.
8. Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga LS (Teegiproovid).

9. Kandke 25 µl igat eluaati LP2 MIDI-plaadilt LS-i PCR-plaadi vastavasse süvendisse.

10. Kõrvaldage tühi LP2 MIDI-plaat.

PCR-i indekseerimine

Selles etapis amplifitseeritakse teegifragmente praimeritega, mis lisavad proovi multipleksimiseks indeksijärjestusi. Saadud toode sisaldab klasteri loomiseks vajalike adapteritega piirnevate cDNA ja/või DNA fragmentide täielikku teeki.

Ettevalmistamine

1. Valmistage järgmised reaktiivid.
 - EPM – hoidke külmas.
 - UPxx – keeristage segamiseks ja tsentrifuugige lühidalt. UPxx on rakenduses Local Run Manager käituse seadistamise ajal kuval Create Run (Käituse loomine) valitud indekspraimer.
 - CPxx – keeristage segamiseks ja tsentrifuugige lühidalt. CPxx on rakenduses Local Run Manager käituse seadistamise ajal kuval Create Run (Käituse loomine) valitud indekspraimer.
2. Veenduge, et iga proovi indeksid vastaksid TSO Comprehensive (EU) analüüsimooduli seadistamise ajal kavandatud käitusele. Järgige kindlasti jaotises [Teekide arv ja indeksite valimine leheküljel 35](#)) toodud juhiseid indeksite valimise kohta.



ETTEVAATUST!

Proovide ja indekspraimerite mittevastavus põhjustab tulemuste valesti esitamist positiivse proovi puuduliku identifitseerimise tõttu.

Protseduur

1. Lisage 5 µl sobivat indekspraimerit (UPxx või CPxx) LS-i PCR-plaadi vastavasse proovisüvendisse vastavalt valitud indeksitele.



ETTEVAATUST!

Käsitsege ja avage korraga ainult üks indekspraimerit katsuti. Sulgege kõik indeksikatsutid uue korgiga kohe pärast kasutamist. Ärge kasutage erinevaid indekspraimereid korraga.

2. Keeristage EPM-i segamiseks 5 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
3. Lisage igasse proovisüvendisse 20 µl EPM-i.
4. Pange LS-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
5. Loksutage 1 minut kiirusel 1200 p/min.
6. Pange amplifitseerimiseelsed reaktiivid tagasi hoiule.

**ETTEVAATUST!**

Tehke kõik järgmised toimingud amplifitseerimisjärgses alas, et vältida amplifitseerimisprodukti ülekandumist.

7. Tsentrifugeerige LS-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut.
8. Asetage eelprogrammeeritud amplifitseerimisjärgsesse termotsüklerisse ja käivitage programm I-PCR. Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
Kui jätkate toiminguga [Esimese hübridisatsiooni seadistamine leheküljel 57](#)), järgige reaktiivide sulatamisjuhiseid jaotises „Ettevalmistamine protokollide etappideks“.
9. Kui programm I-PCR on lõppenud, tsentrifugeerige LS-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut.
10. Märgistage plaat uuesti etiketiga ALS (Amplifitseeritud teegiproovid).

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumisel säilitage ALS-i PCR-plaati temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 30 päeva.

Protokolliks valmistumine

See ettevalmistus on vajalik protokollietappide läbiviimiseks, mis viivad üleöö hübridisatsioonini.

1. Veenduge, et amplifitseerimisjärgse termotsükleri programmid oleksid määratud. Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
2. Võtke reaktiivikatsutid karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 23 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
TCB1	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Esimese hübridisatsiooni seadistamine

Tabel 24 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (hoida külmutatuna) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
TCA1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimese hübridisatsiooni seadistamine

Tabel 25 Sisu komplekti TruSight Oncology Comp Content Set karp (osa nr 20031122)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
OPR1 (punase korgiga)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimese hübridisatsiooni seadistamine
OPD2 (valge korgiga)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimese hübridisatsiooni seadistamine

Esimese hübridisatsiooni seadistamine

Selle protsessi ajal hübridiseerub üks oligokogum cDNA teekidesse ja teine oligokogum gDNA teekidesse, mis valmistati toimingus [PCR-i indekseerimine leheküljel 55](#). Sihtpiirkondade rikastamiseks on vaja kaht hübridiseerimisetappi. Esimeses hübridisatsioonis hübridiseeruvad oligod cDNA ja/või gDNA teekideks üleöö (8 kuni 24 tundi).

Ettevalmistamine

1. Valmistage järgmised reaktiivid.
 - TCB1 – soojendage katsutit 5 minutit temperatuuril 37 °C. Keeristage segamiseks 10 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - TCA1 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - OPR1 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.

- OPD2 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
2. Hoiustatud ALS-i PCR-plaat sulatage toatemperatuurile ja seejärel tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut. Pipettige segamiseks.
 3. Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga HYB1 (Hübridiseerimine 1).

Protseduur

1. Kandke 20 µl igat cDNA ja/või gDNA teeki ALS-i PCR-plaadilt HYB1 PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
2. Pange ALS-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend ja asetage plaat kõrvale. Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
3. Kontrollige TCB1 võimaliku sademe suhtes. Sademe olemasolul soojendage katsutit uuesti ja keeristage seda, kuni kristallid lahustuvad.
4. Lisage HYB1 PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 15 µl TCB1.
5. Lisage HYB1 PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 10 µl TCA1.
6. Lisage sondid.
Ärge kasutage korraga eri tüüpi sonde. Lisage süvendi kohta ainult üks sondikomplekt.
 - **[RNA teegi süvendid]**—Lisage 5 µl OPR1 (punase korgiga) igale RNA-st saadud teegile.
 - **[DNA teegi süvendid]**—Lisage 5 µl OPD2 (valge korgiga) igale DNA-st saadud teegile rikastamiseks.
7. Pange HYB1 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
8. Loksutage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
9. Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm HYB1.
Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
10. Hübridiseerige temperatuuril 57 °C vähemalt 8 tundi ja kuni 24 tundi.
11. Pange hübridiseerimisreaktiivid tagasi hoiule.
12. Säilitage ALS-i PCR-plaati temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 30 päeva.

Protokolliks valmistumine

See ettevalmistus on vajalik protokollide etappide tegemiseks, mis viivad järgmise ohutu peatumispunkti.

2. päeva alguses võtke reaktiivikatsutid karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 26 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
SMB (tumesinise etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	Esimene sihtmärkide kinnistamine Teine sihtmärkide kinnistamine

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
ET2	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Esimene sihtmärkide kinnistamine Teine sihtmärkide kinnistamine
HP3	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Esimene sihtmärkide kinnistamine Teine sihtmärkide kinnistamine Teekide normaliseerimine
TCB1	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Teise hübridisatsiooni seadistamine
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Teine sihtmärkide kinnistamine Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine

Tabel 27 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (hoida külmutatuna) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
EE2	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimene sihtmärkide kinnistamine Teine sihtmärkide kinnistamine Teekide normaliseerimine
EEW	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Esimene sihtmärkide kinnistamine
TCA1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teise hübridisatsiooni seadistamine

Tabel 28 Sisu komplekti TruSight Oncology Comp Content Set karp (osa nr 20031122)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
OPR1 (punane kork)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teise hübridisatsiooni seadistamine
OPD2 (valge kork)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teise hübridisatsiooni seadistamine

Esimene sihtmärkide kinnistamine

See etapp kasutab sihitud huvipiirkondadele hübridiseeritud sondide kinnistamiseks SMB-d. Kerakesi pestakse kolm korda EEW-iga. Rikastatud teegid elueeritakse värske EE2 + HP3 elueerimisseguga ja neutraliseeritakse ET2-ga.

Ettevalmistamine

1. Eelsoojendage MIDI soojendusploki inserdiga mikroproovide inkubaator temperatuurini 57 °C.
2. Valmistage järgmised reaktiivid.

- EEW – keeristage segamiseks 1 minut.
 - EE2 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - HP3 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - SMB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
Kasutage selleks protseduuriks kindlasti **SMB-d**, mitte SPB-d.
 - ET2 – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
3. Valmistage mikrotsentrifuugi katsutisse värske elueerimisegu EE2 + HP3.

Tabel 29 Elueerimisegu EE2 + HP3 esimeseks* sihtmärkide kinnistamiseks

Elueerimisegu komponent	4 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vt jaotisest [Reagentide käsitlemine leheküljel 33](#).

4. Keeristage elueerimisegu EE2 + HP3 ja seejärel tsentrifuugige lühidalt. Pange kõrvale etapiks [Elueerimine leheküljel 61](#).
5. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga CAP1 (Kinnistamine 1).
6. Pange valmis magnet.

Protseduur

Sidumine

1. Eemaldage HYB1 PCR-plaat termotsüklerist.
2. Tsentrifuugige HYB1 PCR-plaati 280 × g juures 1 minut.
3. Keeristage SMB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
Kui sade või kerakestegraanul on olemas, veenduge, et saavutate toatemperatuuri, pipettige graanuli vabastamiseks üles ja alla ning keeristage uuesti suspendeerimiseks.
4. Lisage 150 µl SMB-d kohe igasse CAP1 MIDI-plaadi teegisüvendisse.
Kui kasutate SMB väljutamiseks mahutit, arvestage proovi kohta piisava materjali tagamiseks alikvootimisel ülejäägiteguriga 1,15.
5. Pärast SMB kõigisse proovisüvenditesse lisamist kõrvaldage ülejäänud materjal.
6. Seadke pipett tasemele 50 µl ja kandke kõigi teekide kogumaht HYB1 PCR-plaadilt CAP1 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
7. Kõrvaldage tühi HYB1 PCR-plaat.
8. Pange CAP1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
9. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.

10. Inkubeerige eelsoojendatud mikroproovide inkubaatoris 25 minutit temperatuuril 57 °C.
11. Asetage CAP1 MIDI-plaat 2 minutiks magnetalusel.
12. Hoidke plaati magnetalusel. Kerakestegraanulit häirimata eemaldage ja visake igast süvendist kogu supernatant 200 µl pipetiga ära.

**ETTEVAATUST!**

Jätkake kohe järgmise etapiga ([Pesu leheküljel 61](#)). Ärge laske kerakestegraanulil seista pikka aega ilma vedelikuta.

Pesu

1. Peske kerakesi järgmiselt.
 - a. Eemaldage CAP1 MIDI-plaat magnetaluselt.
 - b. Lisage igasse süvendisse 200 µl EEW-d.
 - c. Kasutage pipetti tasemel 150 µl ja pipettige segamiseks vähemalt 10 korda. Veenduge, et kõik kerakesed resuspendeeruksid.

Veenduge, et ühtki kerakestegraanulit ei jääks alles, aspireerides ettevaatlikult kogu süvendis oleva kerakestelahuse otsakusse. Kontrollige visuaalselt iga süvendi põhja. Kerakestegraanuli olemasolul kallutage pipetiotsakut kerakestegraanuli suhtes, et graanul vabastada. Veenduge, et kerakestegraanul oleks täielikult kastetud lahusesse. Lahus peab olema tumepruun ja homogeenne.
 - d. Pange CAP1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
 - e. Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
 - f. Loksutage 4 minutit kiirusel 1800 p/min.
 - g. Inkubeerige mikroproovide inkubaatoris 5 minutit temperatuuril 57 °C.
 - h. Asetage CAP1 MIDI-plaat 2 minutiks magnetalusel.
 - i. Hoidke plaati magnetalusel. Kerakestegraanulit häirimata eemaldage ja visake igast süvendist kogu supernatant 200 µl pipetiga ära.
2. Peske kerakesi **teist** korda.
3. Peske kerakesi **kolmandat** korda.
4. Kasutage peene otsaga pipetti, et eemaldada igast süvendist EEW jääk.

Elueerimine

1. Eemaldage CAP1 MIDI-plaat magnetaluselt.
2. Keeristage värsket elueerimisseguga EE2 + HP3 ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
3. Lisage igasse CAP1 MIDI-plaadi teegisüvendisse ettevaatlikult 17 µl elueerimisseguga EE2 + HP3.
4. Kõrvaldage järelejäänud elueerimisseguga EE2 + HP3.
5. Pange CAP1 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.

Sulgege servad ja süvendid tihedalt.

6. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
7. Asetage 2 minutiks magnetilusele.
8. Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga ELU1 (Elueerimine 1).
9. Keeristage ET2 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
10. Lisage uue ELU1 PCR-plaadi igasse vastavasse teegisüvendisse 5 µl ET2.
11. Kandke 15 µl eluaati CAP1 MIDI-plaadi igast teegisüvendist ettevaatlikult ELU1 PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
12. Kõrvaldage tühi CAP1 MIDI-plaat.
13. Pange ELU1 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
14. Loksutage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
15. Pange EEW tagasi hoiule.

Teise hübridisatsiooni seadistamine

See etapp seob rikastatud cDNA ja/või gDNA sihitud piirkonnad kinnistussondidega teist korda. Teine hübridisatsioon tagab kinnistatud piirkondade kõrge spetsiifilisuse. Teekide optimaalse rikastatuse tagamiseks viige teine hübridisatsioonietapp läbi temperatuuril 57 °C vähemalt 1,5 tunni ja kuni 4 tunni jooksul.

Ettevalmistamine

1. Valmistage järgmised reaktiivid.
 - TCB1 – soojendage katsutit 5 minutit temperatuuril 37 °C. Keeristage segamiseks 10 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - TCA1 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - OPR1 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - OPD2 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.

Protseduur

1. Kontrollige TCB1 võimaliku sademe suhtes. Sademe olemasolul soojendage katsutit uuesti ja keeristage seda, kuni kristallid lahustuvad.
2. Lisage ELU1 PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 15 µl TCB1.
3. Lisage igasse teegisüvendisse 10 µl TCA1.
4. Lisage igasse süvendisse sama sond, mida kasutati esimese hübridisatsiooni ajal. Lisage süvendi kohta ainult üks sondikomplekt.
Ärge kasutage korraga eri tüüpi sonde.
 - **[RNA teegi süvendid]**—Lisage 5 µl OPR1 (punase korgiga) igale RNA-st saadud teegile.
 - **[DNA teegi süvendid]**—Lisage 5 µl OPD2 (valge korgiga) igale DNA-st saadud teegile rikastamiseks.

5. Pange ELU1 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
6. Loksutage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
7. Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm HYB2.
Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
8. Hübridiseerige temperatuuril 57 °C vähemalt 1,5 tundi ja kuni 4 tundi.
9. Pange hübridiseerimisreaktiivid tagasi hoiule.

Teine sihtmärkide kinnistamine

See etapp kasutab sihitud huvipiirkondadele hübridiseeritud sondide kinnistamiseks SMB-d. Kerakesi pestakse üks kord RSB-ga. Rikastatud teegid elueeritakse värske EE2 + HP3 elueerimisseguga ja neutraliseeritakse ET2-ga.

Ettevalmistamine

1. Eelsoojendage MIDI soojendusploki inserdiga mikroproovide inkubaator temperatuurini 57 °C.
2. Valmistage järgmised reaktiivid.
 - EE2 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - HP3 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - SMB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
Kasutage selleks protseduuriks kindlasti **SMB-d**, mitte SPB-d.
 - RSB – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
 - ET2 – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
3. Valmistage mikrotsentrifuugi katsutisse värske elueerimissegu EE2 + HP3.

Tabel 30 Elueerimisseguga EE2 + HP3 teiseks* sihtmärkide kinnistamiseks

Elueerimisseguga komponent	4 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vt jaotisest [Reagentide käsitlemine leheküljel 33](#).

4. Keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt. Pange kõrvale etapiks [Elueerimine leheküljel 65](#).
5. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga CAP2 (Kinnistamine 2).
6. Pange valmis magnet.

Protseduur

Sidumine

1. Eemaldage ELU1 PCR-plaat termotsüklerist.
2. Tsentrifuugige ELU1 PCR-plaati 280 × g juures 1 minut.
3. Keeristage SMB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
Kui sade või kerakestegraanul on olemas, veenduge, et saavutate toatemperatuuri, pipettige graanuli vabastamiseks üles ja alla ning keeristage uuesti suspendeerimiseks.
4. Lisage 150 µl SMB-d kohe igasse CAP2 MIDI-plaadi teegisüvendisse.
Kui kasutate SMB väljutamiseks mahutit, arvestage proovi kohta piisava materjali tagamiseks alikvootimisel ülejäägiteguriga 1,15.
5. Pärast SMB kõigisse proovisüvenditesse lisamist kõrvaldage ülejäänud materjal.
6. Seadke pipett tasemele 50 µl ja kandke kõigi teekide kogumaht ELU1 PCR-plaadilt CAP2 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
7. Kõrvaldage tühi ELU1 PCR-plaat.
8. Pange CAP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
9. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
10. Inkubeerige mikroproovide inkubaatoris 25 minutit temperatuuril 57 °C.
Kui jätkate toiminguga [Rikastatud teekide amplifitseerimine leheküljel 67](#)), järgige reaktiivide sulatamisjuhiseid jaotises [Protokolliks valmistumine](#).
11. Asetage 2 minutiks magnetalusel.
12. Hoidke CAP2 MIDI plaati magnetalusel. Kerakestegraanulit häirimata eemaldage ja visake igast süvendist kogu supernatant 200 µl pipetiga ära.



ETTEVAATUST!

Jätkake kohe järgmise etapiga ([Pesu leheküljel 64](#)). Ärge laske kerakestegraanulil seista pikka aega ilma vedelikuta.

Pesu

1. Eemaldage CAP2 MIDI-plaat magnetaluselt.
2. Pöörake või keeristage RSB-d segamiseks.
3. Lisage igasse süvendisse 200 µl RSB-d.
4. Pange CAP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
5. Loksutage 4 minutit kiirusel 1800 p/min.
6. Asetage plaat 2 minutiks magnetalusel.

7. Hoidke plaati magnetalusel. Kerakestegraanulit häirimata eemaldage ja visake igast süvendist kogu supernatant 200 µl pipetiga ära.
8. Kasutage peenotsakutega pipetti, et eemaldada igast süvendist järelejäänud RSB.

Elueerimine

1. Eemaldage CAP2 MIDI-plaat magnetaluselt.
2. Keeristage värsket elueerimisegu EE2 + HP3 ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
3. Lisage igasse CAP2 MIDI-plaadi teegisüvendisse 22 µl elueerimisegu EE2 + HP3.
4. Kõrvaldage järelejäänud elueerimisegu EE2 + HP3.
5. Pange CAP2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
6. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
7. Asetage 2 minutiks magnetalsele.
8. Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga ELU2 (Elueerimine 2).
9. Keeristage ET2 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
10. Lisage uue ELU2 PCR-plaadi igasse vastavasse teegisüvendisse 5 µl ET2.
11. Kandke 20 µl eluaati CAP2 MIDI-plaadi igast teegisüvendist ettevaatlikult ELU2 PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
12. Kõrvaldage tühi CAP2 MIDI-plaat.
13. Pange ELU2 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
14. Loksutage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
15. Pange SMB, EE2, HP3, RSB ja ET2 tagasi hoiule.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumisel tsentrifuugige ELU2 PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 7 päeva.

Protokolliks valmistumine

See ettevalmistus on vajalik protokollide etappide tegemiseks, mis viivad järgmise ohutu peatumispunkti.

1. Valmistage ette jääämber või samaväärne.
2. Võtke reaktiivikatsutid karbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 31 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (hoida külmutatuna) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
PPC3	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Rikastatud teekide amplifitseerimine
EPM	-25 °C kuni -15 °C	Hoidke külmas.	Rikastatud teekide amplifitseerimine

Tabel 32 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
SPB (helerohelise etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine
RSB	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine Ettevalmistamine sekveneerimiseks

Rikastatud teekide amplifitseerimine

Selles etapis kasutatakse rikastatud teekide amplifitseerimiseks praimereid.

Ettevalmistamine

1. Hoiustatud ELU2 plaat sulatage toatemperatuurile ja seejärel tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut.

Protseduur

1. Keeristage PPC3 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
2. Lisage ELU2 PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 5 µl PPC3.
3. Keeristage EPM-i segamiseks 5 sekundit ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
4. Lisage igasse teegisüvendisse 20 µl EPM-i.
5. Pange ELU2 PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
6. Loksutage 2 minutit kiirusel 1200 p/min.
7. Asetage termotsüklerisse ja käivitage programm EL-PCR.
Vt jaotist [Termotsüklerite programmeerimine leheküljel 41](#).
Kui jätkate toiminguga [Teekide normaliseerimine leheküljel 70](#)), järgige sulatamisjuhiseid jaotises [Protokolliks valmistumine](#).
8. Pange PPC3 ja EPM tagasi hoiule.

Amplifitseeritud rikastatud teekide puhastamine

See etapp kasutab rikastatud teekide puhastamiseks soovimatutest reaktsiooni komponentidest SPB-d. Kerakesi pestakse kaks korda värske 80% etanooliga. Teeke elueeritakse RSB-ga.

Ettevalmistamine

1. Valmistage järgmised reaktiivid.
 - SPB – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril. Kasutage selleks protseduuriks kindlasti **SPB-d**, mitte SMB-d.
 - RSB – pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
2. Valmistage 15 ml või 50 ml koonilisse katsutisse värske 80% etanool.

Tabel 33 Valmistage ette värske 80% etanool

Reaktiiv	4 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
100% EtOH, puhas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNAasi-/DNAasivaba vesi	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Keeristage värsket 80% EtOH-d segamiseks.
4. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga BIND2 (Sideme puhastamine).
5. Pange valmis magnet.

Protseduur

Sidumine

1. Eemaldage ELU2 PCR-plaat termotsüklerist.
2. Tsentrifuugige ELU2 PCR-plaati 280 × g juures 1 minut.
3. Keeristage SPB-d 1 minut kerakeste resuspendeerimiseks.
4. Lisage 110 µl SPB-d kohe igasse BIND2 MIDI-plaadi teegisüvendisse.
5. Kandke 50 µl igat teeki ELU2 PCR-plaadilt BIND2 MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
6. Kõrvaldage tühi ELU2 PCR-plaat.
7. Pange BIND2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
8. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
9. Inkubeerige 5 minutit toatemperatuuril.
10. Asetage BIND2 MIDI-plaat 5 minutiks magnetilusele.
11. Hoidke plaati magnetilusel. Kerakestegraanulit häirimata eemaldage ja visake igast süvendist kogu supernatant 200 µl pipetiga ära.

Pesemine

1. Peske kerakesi järgmiselt.
 - a. Hoidke BIND2 MIDI-plaat magnetilusel ja lisage igasse süvendisse 200 µl värsket 80% EtOH-d.
 - b. Oodake 30 sekundit.
 - c. Kerakestegraanulit häirimata eemaldage ja visake igast süvendist kogu supernatant 200 µl pipetiga ära.
2. Peske kerakesi **teist** korda.
3. Kasutage pipetti, et eemaldada ja visata ära igast süvendist järelejäänud EtOH.
4. Kõrvaldage kasutamata 80% EtOH.

Elueerimine

1. Eemaldage BIND2 MIDI-plaat magnetiluselt.
2. Pöörake või keeristage RSB-d segamiseks.
3. Lisage igasse teegisüvendisse 32 µl RSB-d.
4. Pange BIND2 MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.

5. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
6. Inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril.
7. Asetage 2 minutiks magnetilusele.
8. Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga PL (Puhastatud teegid).
9. Kandke 30 µl igat eluaati BIND2 MIDI-plaadilt PL-i PCR-plaadi vastavasse süvendisse.
10. Kõrvaldage tühi BIND2 MIDI-plaat.
11. Pange PL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
12. Pange SPB ja RSB tagasi hoiule.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumisel tsentrifuugige PL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 30 päeva.

Protokolliks valmistumine

See ettevalmistus on vajalik protokollide etappide tegemiseks, mis viivad järgmise ohutu peatumispunkti.

1. Võtke reaktiivikatsutid korbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 34 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (hoida külmutatuna) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
LNA1	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine
EE2	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine

Tabel 35 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
LNB1	2 °C kuni 8 °C	Hoidke 30 minutit toatemperatuuril.	Teekide normaliseerimine
HP3	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine Ettevalmistamine sekveneerimiseks
LNW1	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine
LNS1	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Teekide normaliseerimine

2. Kui jätkate samal päeval toiminguga [Ettevalmistamine sekveneerimiseks leheküljel 73](#), järgige sulatamisjuhiseid jaotises [Protokolliks valmistumine](#).

Teekide normaliseerimine

See protsess kasutab LNB1 koos lisanditega (LNA1) iga teegi koguse normaliseerimiseks, et tagada teegi ühtlane jaotumine kogumi teekides. Kerakesi pestakse kaks korda värskelt LNW1-ga. Teeke elueeritakse värskelt elueerimisseguga EE2 + HP3 ja neutraliseeritakse LNS1-ga.

Ettevalmistamine

- Valmistage järgmine reaktiiv.
 - LNB1 – veenduge, et kerakesed oleksid 30 minutit toatemperatuuril.
 - LNA1 – keeristage segamiseks.
 - EE2 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - HP3 – keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
 - LNW1 – keeristage segamiseks. Pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
 - LNS1 – keeristage segamiseks. Pange kõrvale protseduuris kasutamiseks.
- Keeristage LNB1 kerakeste resuspendeerimiseks 1 minut.
Pöörake LNB1 katsutit, et tagada kõigi kerakeste resuspendeerumine.
- Kasutades pipettide komplekti mahuga 800 µl, pipettige LNB1 10 korda üles ja alla, et tagada resuspendeerumine.
- Valmistage koonilisse katsutisse kohe värskelt põhisegu LNA1 + LNB1.



ETTEVAATUST!

Resuspendeerige täielikult katsuti põhjas olev LNB1 kerakestegraanul, et vältida klasteri ebaühtlast tihedust.

Tabel 36 Põhisegu* LNA1 + LNB1

Põhisegu komponent	4 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vt jaotisest [Reagentide käsitlemine leheküljel 33](#).

5. Keeristage põhisegu LNA1 + LNB1. Pange see kõrvale etapi [Seondumine leheküljel 71](#).

6. Valmistage mikrotsentrifuugi katsutisse värske elueerimisegu EE2 + HP3.

Tabel 37 Elueerimisegu EE2 + HP3 teekide normaliseerimiseks*

Elueerimisegu komponent	4 teeki	8 teeki	16 teeki	24 teeki	48 teeki
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* See tabel sisaldab mahu ülejääki. Arvutusi vt jaotisest [Reagentide käsitlemine leheküljel 33](#).

7. Keeristage värsket elueerimisegu ja seejärel tsentrifuugige lühidalt. Pange kõrvale etapiks [Elueerimine leheküljel 72](#).
8. Hoiustatud PL-i PCR-plaat sulatage toatemperatuurile ja seejärel tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut. Pipettige segamiseks.
9. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga BBN (Kerakestepõhine normaliseerimine).
10. Pange valmis magnet.

Protseduur

Seondumine

- Keeristage põhisegu LNA1 + LNB1.
- Lisage 45 µl põhisegu LNA1 + LNB1 kohe igasse BBN-i MIDI-plaadi teegisüvendisse.
- Kõrvaldage ülejäänud põhisegu LNA1 + LNB1.
- Lisage 20 µl igat teeki PL-i PCR-plaadilt BBN-i MIDI-plaadi vastavasse süvendisse.
- Pange BBN-i MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
- Loksutage 30 minutit kiirusel 1800 p/min.
- Pange PL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend ja pange plaat tagasi hoiule.
- Asetage BBN MIDI-plaat 2 minutiks magnetilusele.
- Hoidke plaati magnetilusel. Kerakestegraanulit häirimata eemaldage ja visake igast süvendist kogu supernatant 200 µl pipetiga ära.

Pesemine

- Peske kerakesi järgmiselt.
 - Eemaldage BBN-i MIDI-plaat magnetiluselt.
 - Lisage igasse teegisüvendisse 45 µl LNW1.
 - Pange BBN-i MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
 - Loksutage 5 minutit kiirusel 1800 p/min.

- e. Asetage BBN MIDI-plaat 2 minutiks magnetalusel.
 - f. Hoidke plaati magnetalusel. Kerakestegraanulit häirimata eemaldage ja visake igast süvendist kogu supernatant 200 µl pipetiga ära.
2. Peske kerakesi *teist* korda.
 3. Kasutage peenotsakutega pipetti, et eemaldada igast süvendist järelejäänud supernatant.

Elueerimine

1. Eemaldage BBN-i MIDI-plaat magnetaluselt.
2. Keeristage värsket elueerimisseguga EE2 + HP3 ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
3. Lisage igasse BBN-i MIDI-plaadi teegisüvendisse 32 µl EE2 + HP3 lahust.
4. Kõrvaldage järelejäänud elueerimisseguga.
5. Pange BBN-i MIDI-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
6. Loksutage 2 minutit kiirusel 1800 p/min.
7. Asetage 2 minutiks magnetalusel.
8. Märgistage uus 96 süvendiga PCR-plaat etiketiga NL (Normaliseeritud teegid).
9. Kandke 30 µl eluaati BBN-i MIDI-plaadi igast teegisüvendist ettevaatlikult NL-i PCR-plaadi vastavasse süvendisse.



ETTEVAATUST!

Kui kerakesed on aspireeritud pipetiotsakutesse, väljutage kerakesed tagasi magnetalusel olevale plaadile ja oodake, kuni vedelik on selge (~2 minutit), enne kui jätkate protseduuri järgmise etapiga.

10. Kõrvaldage tühi BBN-i MIDI-plaat.
11. Keeristage LNS1 segamiseks.
12. Lisage uue NL-i PCR-plaadi igasse teegisüvendisse 30 µl LNS1.
13. Pipettige segamiseks 5 korda.
14. Pange NL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
15. Pange LNB1, LNA1, EE2, LNW1 ja LNS1 tagasi hoiule.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumisel tsentrifuugige NL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 32 päeva.

Protokolliks valmistumine

See ettevalmistus on vajalik protokolliga etappide tegemiseks kuni sekveneerimiseni.

Alustage sekveneerimise kulutarvikute ettevalmistamist reaktiivikomplektist NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 tsükli) (osa nr 20028871) vähemalt tund aega enne kasutamist.

1. Eemaldage teegi lahjenduspuhver (HT1) säilituskohast -25 °C kuni -15 °C. Sulatage toatemperatuurile. Pärast sulatamist hoidke külmas.
2. Järgige *NextSeqi 550Dx Instrument viitejuhendis (dokument nr 1000000009513)* muude komplekti kuuluvate kulutarvikute ettevalmistusjuhiseid.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 tsükli)
 - Puhvrikassett NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 tsükli)
 - Läbivooluküvett NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 tsükli)
3. Võtke reaktiivikatsutid korbist välja ja järgige sulatamisjuhiseid.

Tabel 38 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (hoida külmutatuna) karp (osa nr 20031121)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
Sisemine kontrollmaterjal PhiX Internal Control (PX3 või PhiX)	-25 °C kuni -15 °C	Sulatage toatemperatuurile. Pärast sulatamist hoidke külmas.	Ettevalmistamine sekveneerimiseks

Tabel 39 Rikastuskomplekti TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) karp (osa nr 20031123)

Reaktiiv	Säilitamine	Sulatamisjuhised	Protokolli etapp
HP3	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Ettevalmistamine sekveneerimiseks
RSB (roosa etiketiga)	2 °C kuni 8 °C	Tooge toode toatemperatuurile.	Ettevalmistamine sekveneerimiseks

Ettevalmistamine sekveneerimiseks

Iga DNA ja RNA sekveneerimiskäitus peab sisaldama positiivset kontrollmaterjali ja NTC-d. DNA ja RNA NTC-sid sekveneeritakse vajadust mööda korduvalt, nii et iga käitus sisaldaks NTC-d. Iga DNA ja RNA käitus sisaldab eraldi positiivset kontrollmaterjali.

Ettevalmistamine

1. Vt suuniseid jaotises [Teekide arv ja indekse valimine leheküljel 35](#).

2. Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga dHP3 (lahjendatud HP3).
3. Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga dPhiX (Lahjendatud PhiX).
4. Soojendage soojendusplakk mikrotsentrifuugi katsutite jaoks temperatuurile 96 °C.
5. Valmistage ette jääämber või samaväärne.

Kontrollmaterjali PhiX Control lahjendamine ja denatureerimine

1. Keeristage HP3 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
2. Ühendage dHP3 mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNAasi-/DNAasivaba vett
3. Keeristage dHP3 segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
4. Pöörake või keeristage RSB-d segamiseks.
5. Keeristage kontrollmaterjali PhiX segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
6. Ühendage dPhiX-i mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud.
 - 8 µl RSB-d
 - 2 µl kontrollmaterjali PhiX
7. Lisage dPhiX-i katsutisse 10 µl dHP3.
8. Kõrvaldage dHP3 katsuti.
9. Keeristage dPhiX-i katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
10. Inkubeerige dPhiX-i denatureerimiseks 5 minutit toatemperatuuril.
11. Keeristage HT1 segamiseks.
12. Lisage dPhiX-i kohe 980 µl eeljahutatud HT1.
13. Keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
14. Hoidke PhiX külmas kuni selle kasutamiseni teise lahjenduse valmistamisel.
Lõplik kontsentratsioon on 20 pM dPhiX-i.
15. Pange PhiX, HP3 ja RSB tagasi hoiule.

Teekide kogumisse lisamine ja denatureerimine TSO Comprehensive (EU) jaoks

1. Hoiustatud NL-i PCR-plaat sulatage toatemperatuurile ja seejärel tsentrifuugige 280 × g juures 1 minut.
2. Kasutades tasemele 30 µl seatud mitmekanalilist pipetti, pipettige teeke NL-i PCR-plaadil segamiseks 5 korda.
Kasutage iga teegi puhul uusi otsakuid.



ETTEVAATUST!

Optimaalse toimivuse tagamiseks peavad teegid olema põhjalikult segatud.

3. Valige teekide kogumisse lisamiseks, denatureerimiseks ja lahjendamiseks üks järgmistest võimalustest.

- **[1. võimalus]** RNA-proovidest ja DNA-proovidest saadud teekide samaaegne sekveneerimine. Vt [1. võimalus: DNA ja RNA teegid koos leheküljel 75](#).
- **[2. võimalus]** ainult DNA-proovidest saadud teekide sekveneerimine. Vt [2. võimalus: Ainult DNA teegid leheküljel 76](#).
- **[3. võimalus]** ainult RNA-proovidest saadud teekide sekveneerimine. Vt [3. võimalus: Ainult RNA teegid leheküljel 77](#).

1. võimalus: DNA ja RNA teegid koos

1. Märkistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga PRL (Kogumisse lisatud RNA teegid).
2. Märkistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga PDL (Kogumisse lisatud DNA teegid).
3. Kandke 10 µl igat normaliseeritud RNA (cDNA) teeki NL-i plaadilt PRL-i katsutisse. Ärge lisage kaht teeki kogumisse sama indekspraimeriga.
4. Kandke 10 µl igat normaliseeritud DNA teeki NL-i plaadilt PDL-i katsutisse. Ärge lisage kaht teeki kogumisse sama indekspraimeriga.
5. Pange NL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend. Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
6. Keeristage PRL-i ja PDL-i katsuteid segamiseks.
7. Tsentrifugeerige PRL-i ja PDL-i katsuteid lühidalt.
8. Inkubeerige PRL-i ja PDL-i katsuteid soojendusplakis 2 minutit temperatuuril 96 °C.
9. Hoidke PRL-i ja PDL-i katsuteid 5 minutit külmas.
10. Keeristage PRL-i ja PDL-i katsuteid segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
11. Hoidke PRL-i ja PDL-i katsuteid külmas.

Esimese lahjenduse valmistamine

1. Märkistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL1 (Lahjendus 1).
2. Kandke 20 µl PDL-i tühja DIL1 katsutisse.
3. Lisage DIL1 katsutisse 5 µl PRL-i.
4. Kõrvaldage PDL-i ja PRL-i katsutid.
5. Lisage DIL1 katsutisse 475 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 20).
6. Keeristage DIL1 katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.

Teise lahjenduse valmistamine

1. Märkistage 2,0 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL2 (Lahjendus 2).
2. Kandke 40 µl DIL1 tühja DIL2 katsutisse.
3. Kõrvaldage DIL1 katsuti.

4. Lisage DIL2 katsutisse 1660 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 850).
5. Keeristage valmistatud 20 pM dPhiX-i segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
6. Lisage DIL2 katsutisse 2,5 µl valmistatud 20 pM dPhiX-i.
7. Keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
8. Sisestage 1300 µl DIL2 reaktiivikassetti NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 tsüklit).
Lisateavet vt *NextSeqi 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.
9. Kõrvaldage DIL2 katsuti.
10. Tsentrifuugige NL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 32 päeva.
11. Jätkake sekveneerimisega.
Lisateavet vt *NextSeqi 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.

2. võimalus: Ainult DNA teegid

1. Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga PDL (Kogumisse lisatud DNA teegid).
2. Kandke 10 µl igat normaliseeritud DNA teeki NL-i plaadilt PDL-i katsutisse.
Ärge lisage kaht teeki kogumisse sama indekspraimeriga.
3. Pange NL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt.
4. Keeristage PDL-i katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
5. Inkubeerige PDL-i katsutit soojendusplakis 2 minutit temperatuuril 96 °C.
6. Hoidke PDL-i katsutit 5 minutit külmas.
7. Keeristage PDL-i katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
8. Hoidke PDL-i katsutit külmas.

Esimese lahjenduse valmistamine

1. Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL1 (Lahjendus 1).
2. Kandke 10 µl PDL-i tühja DIL1 katsutisse.
3. Kõrvaldage PDL-i katsuti.
4. Lisage DIL1 katsutisse 190 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 20).
5. Keeristage DIL1 katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.

Teise lahjenduse valmistamine

1. Märgistage 2,0 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL2 (Lahjendus 2).
2. Kandke 40 µl DIL1 tühja DIL2 katsutisse.
3. Kõrvaldage DIL1 katsuti.

4. Lisage DIL2 katsutisse 1660 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 850).
5. Keeristage valmistatud 20 pM dPhiX-i ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
6. Lisage DIL2 katsutisse 2,5 µl valmistatud 20 pM dPhiX-i.
7. Keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
8. Sisestage 1300 µl DIL2 reaktiivikasseti NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 tsüklit).
Lisateavet vt *NextSeqi 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.
9. Kõrvaldage DIL2 katsuti.
10. Tsentrifuugige NL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 32 päeva.
11. Jätkake sekveneerimisega.
Lisateavet vt *NextSeqi 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.

3. võimalus: Ainult RNA teegid

1. Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga PRL (Kogumisse lisatud RNA teegid).
2. Kandke 10 µl igat normaliseeritud RNA (cDNA) teeki NL-i plaadilt PRL-i katsutisse.
Ärge lisage kaht teeki kogumisse sama indekspraimeriga.
3. Pange NL-i PCR-plaadile adhesiivne plaaditihend.
Sulgege servad ja süvendid tihedalt, et vältida aurustumist.
4. Keeristage PRL-i katsutit segamiseks.
5. Tsentrifuugige PRL-i katsutit lühidalt.
6. Inkubeerige PRL-i katsutit soojendusploki 2 minutit temperatuuril 96 °C.
7. Hoidke PRL-i katsutit 5 minutit külmas.
8. Keeristage PRL-i katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
9. Hoidke PRL-i katsutit külmas.

Esimese lahjenduse valmistamine

1. Märgistage mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL1 (Lahjendus 1).
2. Kandke 10 µl PRL-i tühja DIL1 katsutisse.
3. Kõrvaldage PRL-i katsuti.
4. Lisage DIL1 katsutisse 190 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 20).
5. Keeristage DIL1 katsutit segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.

Teise lahjenduse valmistamine

1. Märgistage 2,0 ml mikrotsentrifuugi katsuti etiketiga DIL2 (Lahjendus 2).
2. Kandke 40 µl DIL1 tühja DIL2 katsutisse.

3. Kõrvaldage DIL1 katsuti.
4. Lisage DIL2 katsutisse 1646 µl eeljahutatud HT1 (lahjendussuhe 1 : 843).
5. Keeristage valmistatud 20 pM dPhiX-i ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
6. Lisage DIL2 katsutisse 16,7 µl valmistatud 20 pM dPhiX-i.
7. Keeristage segamiseks ja seejärel tsentrifuugige lühidalt.
8. Sisestage 1300 µl DIL2 reaktiivikasseti NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 tsükli).
Lisateavet vt *NextSeqi 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.
9. Kõrvaldage DIL2 katsuti.
10. Tsentrifuugige NL-i PCR-plaati 280 × g juures 1 minut ning säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 32 päeva.
11. Jätkake sekveneerimisega.
Lisateavet vt *NextSeqi 550Dx Instrument viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.

Tulemuste tõlgendamine

TSO Comprehensive (EU) analüüsi sekveneerimistulemused esitatakse iga proovi kohta eraldi PDF- ja JSON-aruandes. Proovitasandil koostatakse ka väikese katvuse aruanne Low Depth Report (`LowDepthReport.tsv`).

Käitusetasandil luuakse järgmised väljundfailid:

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

PDF- ja JSON-aruannetes kuvatakse ainult kvaliteedikontrolli läbinud variandid.

Üksikasjalikku analüüsivate vt *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoo juhend (dokument nr 200008661)*.

Kaasdiagnostika tulemused

Iga kaasdiagnostika (CDx) sihtotstarbe kohta on järgmised kolm võimalikku tulemust:

- **Positive** (Positiivne) – variant või biomarker on tuvastatud ja klassifitseeritud kui tase 1 (CDx).
- **Not detected** (Ei tuvastatud) – proovist ei tuvastatud CDx-i sihtotstarbega seotud variante ega biomarkereid. Proovi jaoks valitud kasvajatüüp sobib CDx-ile.
- **No result** (Tulemus puudub) – variandi olekut pole võimalik määrata ühel või mitmel järgmistest põhjustest:
 - CDx-i sihtotstarbe ei ole analüüsitud proovile kohaldatav, kuna proovi jaoks valitud kasvajatüüp ei sobi CDx-i kasvajatüübiks.
 - Sekveneerimiskäituse kvaliteedikontrolli spetsifikatsioonid ebaõnnestusid.
 - Teegi nõutud kvaliteedikontrolli spetsifikatsioonid ebaõnnestusid.
 - Sobivat nukleiinhapet ei analüüsitud.

Kõik CDx-i sihtotstarbe tulemused esitatakse JSON-aruande jaotises „Companion Diagnostic Results” (Kaasdiagnostika tulemused). Üksnes positiivse tulemusega sihtotstarbed loetletakse PDF-aruande jaotises „Companion Diagnostic Results” (Kaasdiagnostika tulemused).

Kasvaja profiili koostamise variandid

TSO Comprehensive (EU) esitab somaatilised variandid tõendatud kliinilise või võimaliku kliinilise tähtsusega variantide esitamisel. Tarkvara TSO Comprehensive (EU) analüüsi kasutab teabebaasi (KB), millega määratakse, kas iga tuvastatud ja sobiv variant ([Tabel 2](#)) on kliiniliselt tähtis või võimaliku kliinilise tähtsusega ravi, diagnostika või prognostiliste seoste alusel. KB arvestab ka seda, kas analüüsitud kasvajatüübiga on taolisi seoseid täheldatud (või mitte). KB-sse pole lisatud eelsoodumusi või seoseid vähiriskiga. Eemaldatud on levinud polümorfismid.

Kasvaja profiili koostamise variantide korral liigitatakse positiivsed tulemused vastavalt installitud KB-le ja tuvastatud kasvajatüübile tõendatud kliinilise tähtsusega geneetilisteks leidudeks (2. tase) ning võimaliku kliinilise tähtsusega geneetilisteks leidudeks (3. tase).

Kvaliteedikontrolli nurjumisel puuduvad nurjunud kvaliteedikontrollinäitajaga seotud variantitüüpide puhul tulemused. Lisateavet vt [Tabel 40](#) ja [Tabel 41](#). Kasvaja profiili koostamise asendid, mille katvus pole piisav, loetletakse aruandes „Low Depth Report” (Väikese katvuse aruanne), mitte aruandes TSO Comprehensive (EU).

Kvaliteedikontroll

- Teavet nukleiinhapete kvantifitseerimise ja sisendmaterjalide miinimumnõuete kohta vt jaotisest [Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine leheküljel 27](#).
- Sekveneerimiskäitus ja proovi kehtivus määratakse kindlaks automaatselt ja esitatakse TSO Comprehensive (EU) analüüsismoodulis. Üksikasjalikku analüüsiteavet vt *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoo juhend (dokument nr 200008661)*.
- TSO Comprehensive (EU) analüüsi aruandes, mis on saadaval PDF- ja JSON-vormingus, võetakse kokku kvaliteedikontrolli tulemused. Aruandefailid asuvad analüüsi kaustas. Analüüsikausta asukohta (sisaldab PDF- ja JSON-aruandeid) ja käituse kausta leiate jaotisest *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoo juhend (dokument nr 200008661)*.

Tabel 40 TSO Comprehensive (EU) aruande tulemuste kvaliteedikontrolli mõõdikud

Väljundi tüüp	Mõõdik	Spetsifikatsioon	Kirjeldus	Spetsifikatsiooni mittetäitmise mõju*
Sekveneerimiskäitus	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Filtri läbinud (passing filter, PF) lugemite protsent.	Sekveneerimiskäitus on kehtetu. Käituses ei ole ühegi proovi kohta teatatud ühtegi tulemust.

Väljundi tüüp	Mõõdik	Spetsifikatsioon	Kirjeldus	Spetsifikatsiooni mittetäitmise mõju*
	PCT_Q30_R1 (%)	$\geq 80,0$	Keskmine aluse nimetuste protsent, millel on 1. lugemi korral kvaliteediskoor Q30 või suurem.	Sekveneerimiskäitus on kehtetu. Käituses ei ole ühegi proovi kohta teatatud ühtegi tulemust.
	PCT_Q30_R2 (%)	$\geq 80,0$	Keskmine aluse nimetuste protsent, millel on 2. lugemi korral kvaliteediskoor Q30 või suurem.	
DNA teegid	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 VÕI > 3106 ja $P_VALUE \leq 0,049$	Mõõdik, millega hinnatakse saastumise tõenäosust levinud variantide VAF-i abil. Saastatuse skoor, mis põhineb SNP VAF-i jaotusel. Saastumise P väärtust kasutatakse kõrgelt ümberpaigutatud genoomide hindamiseks. See kehtib ainult siis, kui saastumise skoor on üle ülemise piirväärtuse.	DNA tulemusi ei esitata.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Proovi fragmentide mediaanpikkus.	Kasvaja mutatsioonikoormuse (tumor mutational burden, TMB) ega DNA väikeste variantide tulemusi ei esitata.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (arv)	≥ 150	Mediaanne eksoni fragmentide kattuvus üle kõikide eksoni aluste.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	50-kordse fragmendi katvusega eksoni aluspaaride protsent.	

Väljundi tüüp	Mõõdik	Spetsifikatsioon	Kirjeldus	Spetsifikatsiooni mittetäitmise mõju*
	USABLE_MSI_SITES (arv)	≥ 40	Mikrosatelliitide ebastabiilsuse (microsatellite instability, MSI) määramiseks kasutatavate MSI saitide arv (mikrosatelliitide saitide arv, mille lugemite ulatus on piisav mikrosatelliitide ebastabiilsuse tuvastamiseks).	MSI tulemusi ei esitata.
	COVERAGE_MAD (arv)	$\leq 0,210$	Iga CNV sihtpiirkonna normeeritud arvu mediaanist absoluuthälvete mediaan.	Geeniampifikatsiooni tulemusi ei esitata.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (arv)	$\geq 1,0$	Sihtmärk-CNV kaupa töötlemata bin-arvu mediaan.	
RNA teegid	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Proovi fragmentide mediaanpikkus.	Fusioonide ega splaissvariantide tulemusi ei esitata.

Väljundi tüüp	Mõõdik	Spetsifikatsioon	Kirjeldus	Spetsifikatsiooni mittetäitmise mõju*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koefitsient)	$\leq 0,93$	Mõõdik MEDIAN_CV_GENE_500X näitab katvuse ühtlust. Igale vähemalt 500-kordse katvusega geenile arvutatakse katvuse variatsioonikoefitsient üle kogu geeni. See mõõdik on taoliste väärtuste mediaan. Mõõdiku suur väärtus näitab suurt varieeruvust ja probleeme teegi ettevalmistamisel, nt vähest proovi sisendteavet ja/või raskuseid sondi sadestamisel. Mõõdik arvutatakse kõikide lugemite põhjal (sh duplikaatidena märgitud lugemid).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (arv)	$\geq 9\,000\,000$	Sihtpiirkondadesse kaardistatud lugemite koguarv. Mõõdik arvutatakse kõikide lugemite põhjal (sh duplikaatidena märgitud lugemid).	

* Õnnestunud tulemuste puhul kuvatakse teade PASS (Läbitud).

Tabel 41 TSO Comprehensive (EU) analüüsi aruande tulemuste kontrolli mõõdikud

Väljundi tüüp	Mõõdik	Spetsifikatsioon	Spetsifikatsiooni mittetäitmise mõju*
Positiivne kontrollmaterjal	DNA-väline kontrollmaterjal	24 määratud variandist tuvastatud 23	Muutke patsiendiproovid kontrollproovide tulemuste põhjal käsitsi kehtetuks. Analüüsimooduli tarkvara ei muuda patsiendiproove kontrollproovide tulemuste põhjal automaatselt kehtetuks.
	RNA-väline kontrollmaterjal	13 määratud variandist tuvastatud 12	

Väljundi tüüp	Mõõdik	Spetsifikatsioon	Spetsifikatsiooni mittetäitmise mõju*
Matriitsita kontrollmaterjal	DNA eksonite mediaankatvus TSO Comprehensive (EU) jaoks	≤ 8	Muutke patsiendiproovid kontrollproovide tulemuste põhjal käsitsi kehtetuks.
	RNA geen üle mediaanpiirväärtuse	≤ 1	Analüüsimooduli tarkvara ei muuda patsiendiproove kontrollproovide tulemuste põhjal automaatselt kehtetuks.

* Õnnestunud tulemuste puhul kuvatakse teade PASS (Läbitud).

- Korrake kehtetuid sekveneerimiskäitusi.
- Korrake järgmiste tulemustega teekide analüüse:
 - Saastunud DNA teegid
 - Kehtetud RNA teegid
 - Analüüside kordamine võimaldab saada ühe, kuid mitte kõigi varianditüüpide puhul kehtetute DNA teekide korral rohkem variantide või biomarkerite tulemusi.
- Positiivseid kontrollmaterjale hinnatakse variantide avastamise suhtes. Kui positiivsed kontrollmaterjalid ei vasta variantide avastamise spetsifikatsioonidele, muutke sekveneerimiskäitus käsitsi kehtetuks. Analüüsimooduli tarkvara ei muuda patsiendiproove kontrollproovide tulemuste põhjal automaatselt kehtetuks.
- NTC-sid hinnatakse DNA puhul eksonite mediaankatvuse ja RNA puhul üle mediaanpiirväärtuse jäävate geenide suhtes. Kui negatiivsed kontrollmaterjalid ei vasta spetsifikatsioonidele, muutke teegi valmistamise sündmus ja kõik seotud sekveneerimiskäitused käsitsi kehtetuks. Analüüsimooduli tarkvara ei muuda patsiendiproove kontrollproovide tulemuste põhjal automaatselt kehtetuks.
- Tehke täiendavad kvaliteedikontrolli toimingud vastavalt kohalikele, piirkondlikele ja/või riiklikele määrustele või akrediteerimisnõuetele.

Lisateavet sekveneerimiskäituste või teekide analüüside kordamise kohta vt jaotisest [Tõrkeotsing leheküljel 84](#).

Tõrkeotsing

Töövoo tõrkeotsinguks kasutage järgmist tabelit. Kui sekveneerimiskäitus või proovi teekide valmistamine nurjub kaks korda, võib vajalik olla täiendav tõrkeotsing. Võtke ühendust Illumina tehnilise toega.

Probleem	Võimalik põhjus	Soovitav tegevus
Sekveneerimiskäitus ei läbi käituse kvaliteedikontrolli spetsifikatsioone	- Kogumise viga - Lahjenduse viga - PRL-i/PDL-i mittetäielik soojusdenatureerimine - Probleemid kulutarvikute ettevalmistamise sekveneerimisega (näiteks ei sulatata piisavalt, kondensatsioon/praht läbivooluküvetil)	Teekide kordussekveneerimine normaliseeritud teekide (NL) PCR-plaadilt. Vt jaotist Ettevalmistamine sekveneerimiseks leheküljel 73.
	- Rikastussondide vale kasutamine (näiteks DNA proovide puhul kasutatavad OPR1 sondid, RNA proovide jaoks kasutatavad OPD2 sondid) - Viga teegi ettevalmistamise töövoos esimese hübridisatsioonietapi ajal või pärast seda.	Korrake rikastamisetappe amplifitseeritud teekide proovide (ALS) PCR-plaadilt saadud teekide puhul. Vt jaotist Esimese hübridisatsiooni seadistamine leheküljel 57.
	Proovi sisendmahu nõuded pole täidetud	Käivitage teekide valmistamine alates töövoo algusest. Vt jaotist RNA denatureerimine ja anniilimine leheküljel 43 või gDNA fragmentimine leheküljel 48 .
	Viga teegi ettevalmistamise töövoos PCR-i indekseerimise etapi ajal või enne seda	Korrake rikastamisetappe amplifitseeritud teekide proovide (ALS) PCR-plaadilt saadud teekide puhul. Vt jaotist Esimese hübridisatsiooni seadistamine leheküljel 57 .
	Seadme probleem	Võtke ühendust Illumina tehnilise toega.

Probleem	Võimalik põhjus	Soovitav tegevus
Tõrge aruande loomisel või üldine seadme viga (nt võrgutõrge, tõrked reaktiivide laadimisel / mahalaadimisel jne)	Tarkvara või seadme probleem.	Aruande koostamisel abi saamiseks vt Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoo juhend (dokument nr 200008661). Täiendava abi saamiseks pöörduge Illumina tehnilise toe poole.
DNA teek ei läbi kvaliteedikontrolli spetsifikatsioone.	Proovi sisendmahu nõuded pole täidetud.	Veenduge, et proovi sisendmaht oleks sobiv, ja korrake teekide ettevalmistamist alates gDNA fragmentimise etapist. Vt jaotisi Nõuded proovile leheküljel 26 ning Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine leheküljel 27 .
	Kasutamiseviga või seadme tõrge analüüsi töövoos.	Korrake teekide valmistamist ühes järgmistest etappidest olenevalt sellest, kus kahtlustatakse kasutusviga või seadme tõrge tekkis. Kui te viga ei tuvasta või tekivad muud tõrked, pöörduge käituse tõrkeotsinguks Illumina tehnilise toe poole. - Teekide kordussekveneerimine normaliseeritud teekide (NL) PCR-plaadilt. Vt jaotist Ettevalmistamine sekveneerimiseks leheküljel 73. - Korrake rikastamisetappe amplifitseeritud teekide proovide (ALS) PCR-plaadilt saadud teekide puhul. Vt jaotist Esimese hübridisatsiooni seadistamine leheküljel 57. - Käivitage teekide valmistamine alates töövoo algusest. Vt jaotist gDNA fragmentimine leheküljel 48.

Probleem	Võimalik põhjus	Soovitav tegevus
	Kriteeriumid CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_ VALUE pole täidetud.	Teavet ristsaastumise vältimise kohta vaadake jaotisest „Hoiatused ja ettevaatusabinõud“. Vaadake üle plaadi paigutus ja teekide indekseerimine veendumaks, et sama indeksiga teek ei sekveneeritaks koos. Asjassepuutuvate teekide puhul käivitage teekide valmistamine alates töövoo algusest. Vt jaotist gDNA fragmentimine leheküljel 48. Proovi eraldamise käigus võis tekkida saastumine. Vajalik võib olla eraldamise kordamine tagamaks, et proov on saastest vaba.
	Kasutatav MSI nurjus.	Vaadake üle ultraheliaparaadi tootja kasutusjuhised (sh veetase ja katsuti tüüp). Veenduge, et analüüsis kasutatakse õiget proovi sisendmahtu. Vt jaotisi Nõuded proovile leheküljel 26 ning Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine leheküljel 27. Kui proov on ülemäära fragmenditud või kahjustunud, võib vajalik olla uue proovi eraldamine ja/või gDNA fragmentimise etapi kordamine.
	Proov on ülemäära fragmenditud või sisaldab nukleiinhapete kahjustust, mis mõjutab võimet luua piisavalt kordumatuid teke.	Vaadake üle Ultraheliatori konfiguratsiooni sättest DNA fragmenteerimiseks leheküljel 23 ja ultraheliatori tootja kasutustingimused ja tööseaded (sh vee tase ja katsuti tüüp). Veenduge, et analüüsis kasutatakse õiget proovi sisendmahtu. Vt jaotisi Nõuded proovile leheküljel 26 ning Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine leheküljel 27. Kui proov on ülemäära fragmenditud või kahjustunud, võib vajalik olla uue proovi eraldamine ja/või gDNA fragmentimise etapi kordamine.

Probleem	Võimalik põhjus	Soovitav tegevus
RNA teek ei läbi kvaliteedikontrolli spetsifikatsioone.	Proovi sisendmahu nõuded pole täidetud.	Veenduge, et proovi sisendmaht oleks sobiv, ja korrake teekide ettevalmistamist alates RNA denatureerimise ja anniilimise etapist. Vt jaotisi Nõuded proovile leheküljel 26 ning Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine leheküljel 27 .
	Kasutamiseviga või seadme tõrge analüüsi töövoos.	Korrake teekide valmistamist ühes järgmistest etappidest olenevalt sellest, kus kahtlustatakse kasutusviga või seadme tõrge tekkis. Kui te viga ei tuvasta või tekivad muud tõrked, pöörduge käituse tõrkeotsinguks Illumina tehnilise toe poole. - Teekide kordussekveneerimine normaliseeritud teekide (NL) PCR-plaadilt. Vt jaotist Ettevalmistamine sekveneerimiseks leheküljel 73. - Korrake rikastamisetappe amplifitseeritud teekide proovide (ALS) PCR-plaadilt saadud teekide puhul. Vt jaotist Esimese hübridisatsiooni seadistamine leheküljel 57. - Käivitage teekide valmistamine alates töövoogu algusest. Vt jaotist RNA denatureerimine ja anniilimine leheküljel 43.
	Proov võib olla ülemäära fragmenditud või sisaldada nukleiinhapete kahjustust, mis mõjutab võimet luua piisavalt kordumatuid teeke	Veenduge, et analüüsis kasutataks õiget proovi sisendmahtu. Vt jaotisi Nõuded proovile leheküljel 26 ning Nukleiinhapete eraldamine, kvantifitseerimine ja säilitamine leheküljel 27 . Kui proov on ülemäära fragmenditud või kahjustunud, võib vajalik olla uue proovi eraldamine.

Probleem	Võimalik põhjus	Soovitav tegevus
Positiivse kontrollmaterjali nurjumine (DNA/RNA).	Proovi positiivse kontrollmaterjali sisendmahu nõuded pole täidetud Kasutamiseviga või seadme tõrge analüüsi töövoos.	Veenduge, et analüüsis kasutataks õiget sisendmahtu. Vaadake üle plaadi paigutus ja veenduge, et sobivad reaktiivid (sondid, indeksid) on sobivates süvendites. Veenduge, et positiivset kontrollproovi säilitataks etiketi kohaselt. Kõigi sama positiivse kontrollmaterjaliga proovide puhul korrake teekide valmistamist ühes järgmistest etappidest olenevalt sellest, kus kahtlustatav kasutusviga või seadme tõrge tekkis. Kui te viga ei tuvasta või tekivad muud tõrked, pöörduge käituse tõrkeotsinguks Illumina tehnilise toe poole. - Teekide kordussekveneerimine normaliseeritud teekide (NL) PCR-plaadilt. Vt jaotist Ettevalmistamine sekveneerimiseks leheküljel 73. - Korrake rikastamisetappe amplifitseeritud teekide proovide (ALS) PCR-plaadilt saadud teekide puhul. Vt jaotist Esimese hübridisatsiooni seadistamine leheküljel 57. - Käivitage teekide valmistamine alates töövoos algusest. Vt jaotist RNA denatureerimine ja anniilimine leheküljel 43 või gDNA fragmentimine leheküljel 48.
NTC nurjumine (DNA/RNA).	Tekkis ristsaastumine või tööala saastumine. Teegi vale indekseerimine.	Teavet tööalade dekontamineerimise ja ristsaastumise vältimise kohta vaadake jaotisest „Hoiatused ja ettevaatusabinõud“. Vaadake üle plaadi paigutus ja teekide indekseerimine veendumaks, et sama indeksiga teekke ei sekveneeritaks koos. Korrake teegi valmistamist alates töövoos algusest kõigi teekide puhul, mis kasutavad ühiselt matriitsita kontrolli.

Probleem	Võimalik põhjus	Soovitav tegevus
Tarkvara näitab, et positiivseid ja/või negatiivseid kontrollmaterjale ei kaasatud sekveneerimiskäitusse.	Vähitüübi vale määrang rakenduse Local Run Manager käituse kavandamisel.	Seadke analüüs koos õigesti tuvastatud kontrollmaterjalidega vastavalt analüüsimooduli töövoo juhendile uuesti järjekorda (vt dokumenti <i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoo juhend (dokument nr 200008661)</i>).

Toimivusnäitajad

TSO Comprehensive (EU) on sihitud NGS-paneel, mis tuvastab muutused 517 geenis. Kõigi 517 geeni lõikes saab esitada DNA väikeseid variante (ühe nukleotiidi variandid [SNV-d], mitme nukleotiidi variandid [MNV-d], insertioonid ja deletsioonid). Kasvaja mutatsioonikoormus on esitatud skoorina, mis põhineb mittejuhtivate somaatiliste variantide arvul megabaasi kohta (vt üksikasju jaotisest *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analüüsimooduli töövoo juhend (dokument nr 200008661)*). MSI esitatakse olekuna. Saab esitada MET ja ERBB2 geenide geeniamplifikatsioone. Fusioonid sobivad aruandluseks 23 geenist, mis on näidatud jaotises [Analüüsi kokkuvõte ja selgitus leheküljel 1](#). Saab esitada MET ja EGFR geenidest pärit splaissvariante. Esitamiseks peavad variandid olema tuvastatud ja esindatud TSO Comprehensive (EU) analüüsi KB-s ning vastama esitamistingimustele analüüsitud koetüübi alusel. Esitamiseks peab NTRK fusioonide fusioonipartner olema 5' ja NTRK kinaasi domeen olema terve.

DNA väikeste variantide puhul kasutati iseloomulikku lähenemist paneelil sihitud geenide kehtivuse määramiseks, kasutades SNV-sid, MNV-sid, insertioone ja deletsioone esindavaid andmeid. Geeniamplifikatsioonide, fusioonide ja splaissvariantide puhul tehti analüüsimine geenitasemel. TMB-d ja MSI-d hinnati vastavalt näidatule. NTRK fusioonide CDx nõuete jaoks analüüsiti FFPE-proovide fusioone uuringutes, mis keskendusid nõudespetsiifilisele toimivusnäitajale (näiteks avastamispiir, laborisisene kordustäpsus, korratavus, täpsus ja kliiniline toimivus).

[Tabel 42](#) on toodud erinevates uuringutes arvatud mõõdikute definitsioonid.

Tabel 42 Mõõdiku definitsioon

Mõiste	Definitsioon
Positiivsete protsentuaalne kokkulangevus (PPA)	Õigesti tuvastatud positiivsete vastete protsent kõigist positiivsetest vastetest ortogonaalmeetodi suhtes.

Mõiste	Definitsioon
Negatiivsete protsentuaalne kokkulangevus (NPA)	Õigesti tuvastatud negatiivsete vastete protsent kõigist negatiivsetest vastetest ortogonaalmeetodi suhtes.
Üldine protsentuaalne kokkulangevus (OPA)	Õigesti tuvastatud positiivsete ja negatiivsete vastete protsent kõigist vaatlustest ortogonaalmeetodi suhtes.
Positiivsete vastete protsent (PPC)	Sihtmärgi puhul positiivsete vaatluste protsent kõigist sihtmärgi puhul eeldatavalt positiivsetest vaatlustest.
Negatiivsete vastete protsent (PNC)	Sihtmärgi puhul negatiivsete vaatluste protsent kõigist sihtmärgi puhul eeldatavalt negatiivsetest vaatlustest.
n/N	Positiivsete või negatiivsete vaatluste arv (n) jagatuna üldvaatlustega (N) vastavalt PPC või PNC arvutamiseks. (n) ja (N) väärtused võivad olla erinevatel tasanditel (nt variant või geen) või grupis kombineeritud (nt SNV-d).
Standardhälve (SD)	Muutuja väärtuste variatsiooni suuruse mõõtmine selle keskmise kohta.
Variatsioonikordaja (%CV)	Standardhälve jagatuna keskmisega protsendina.

Ristsaastumine

Ristsaastumise uuring viidi läbi hindamaks, kas valepositiivsed tulemused olid tingitud prooviteegi valmistamise käigus tekkinud süvenditevahelisest saastumisest või järjestikuste sekveneerimiskäituste korral tekkinud analüüsidevahelisest saastumisest. See analüüs tehti DNA väikeste variantide (mis mõjutavad ka TMB-d), fusioonide, geeniamplifikatsioonide ja MSI jaoks. Teegid valmistati karakteriseeritud proovidest, kasutades malelauapaigutust vaheldumisi asetatud proovidega, et hinnata süvenditevahelist saastumist, ning vahelduvate indeksitega, et hinnata sekveneerimise analüüsidevahelist saastumist järjestikusel sekveneerimisel samas seadmes NextSeq 550Dx Instrument. Ristsaastumise uuringul ei ilmnunud igas proovis avastatud variantide uurimisel ühtki ristsaastumisjuhtu, samuti ei tuvastatud ühtki valepositiivset juhtu.

TSO Comprehensive (EU) analüüsi jaoks oli ette nähtud kaks kvaliteedikontrolli mõõdikut (CONTAMINATION_SCORE ja P_VALUE), et tuvastada proovide saastumist DNA proovides. Hinnati saastumistuvastuse tundlikkust. FFPE kasvaja DNA proovid segati erinevate FFPE kogustega normaalsete DNA proovidega, et luua sihilikult saastunud proove.

Kokku tekitati 1112 saastumisvaatlust ja saastumist tuvastati 95% (1054) vaatlustest. Tuvastamismäära suurendati 96%-ni (939/976), kui saastumise protsent oli vahemikus 10% kuni 90% (mass/mass). 37-st vaatlusest vahemikus 10% kuni 90% saastumise puhul, kus saastumist ei tuvastatud, ei vastanud 12 katvusspetsifikatsioonile, et nimetada neid väikesteks DNA variantideks. Madal katvus takistab saastumise

tuvastamist, kuid väikeste DNA variantide puhul pole teatatud, et need leevendaksid saastumise mõju. Viisteist vaatlust ei vastanud geeniamplifikatsiooni spetsifikatsioonile (keskmine binaararvu kvaliteedikontrolli mõõdik), et nimetada seda geeniamplifikatsiooniks. Proovide puhul ei teatata geeniamplifikatsiooni tulemustest.

Uuring näitas, et TSO Comprehensive (EU) analüüsi puhul eeldatakse ristsaastumise väikest esinemissagedust süvendite või käituste vahel. Need tulemused koos tarkvaras sisalduvate saastemõõdikutega leevendavad proovi saastumisest tingitud valevariandi tulemuste riski.

Nukleiinhapete eraldamiskomplekti hindamine

Analüüsiga TSO Comprehensive (EU) hinnati kolme müügilolevat DNA ja RNA eraldamiskomplekti. Kolm eraldamiskomplekti eraldasid samadest FFPE koelõikudest nii DNA kui ka RNA. Komplektid erinesid deparafiniseerimisaine ja nukleiinhapete sidumisetappide poolest (Tabel 43). 1. komplekt oli peamine eralduskomplekt, mida kasutati TSO Comprehensive (EU) analüüsi toimivuse kindlaksmääramiseks.

Tabel 43 Komplekti omadused

Komplekt	Deparafiniseerimisaine	Nukleiinhapete sidumine
1	Patenditud	Veerg
2	Ksüleen	Veerg
3	Mineraalõli	Magnetkerakesed

Tabel 44 ja Tabel 45 on kokkuvõtte eraldamiskomplektide mõjust teegi kehtivusele ja variantide avastamisele. Erinevusest teatati, kui eraldamiskomplektide meetmed erinesid oluliselt. Eraldamiskomplektide keskmised erinevused arvutati 1. komplekti kontrollina, kuna 1. komplekti kasutati enamiku TSO Comprehensive (EU) analüütilistes uuringutes kasutatud nukleiinhapete eraldamiseks. Teatati keskmisest erinevusest 1. komplekti suhtes, et illustreerida, kuidas erinevad eraldamiskomplektid mõjutaksid teisi TSO Comprehensive (EU) analüütilisi uuringuid.

Tabel 44 Eralduskomplekti mõju teekide kehtivusele

Variandi tüüp	Teegi kvaliteedimõõdikud	Keskmine erinevus võrreldes komplektiga 1
DNA väikesed variandid / TMB	Eksonite mediaankatvus (arv) PCT ekson 50X (%) Keskmine insertiooni suurus (bp)	Komplekt 2 madalam 56 lugemi võrra Komplekt 3 kõrgem 0,298% võrra Komplekt 2 ja komplekt 3 madalam 3 bp võrra
DNA MSI	Kasutatavad MSI keskused	Komplekt 3 kõrgem 8 keskuse võrra

Variandi tüüp	Teegi kvaliteedimõõdikud	Keskmine erinevus võrreldes komplektiga 1
DNA geeniamplifikatsioon	Katvus MAD (arv)	Komplekt 2 madalam 0,0043 võrra
	Binide mediaanarv	Komplekt 2 on madalam 0,5825 võrra, komplekt 3 kõrgem 0,3086 võrra
RNA (fusioonid/splaiisvariandid)	Insertsiooni mediaansuurus (bp) Logi (mediaan CV Gene500X) Kokku sihtlugemitel	Komplekt 3 kõrgem 2 bp võrra Komplekt 2 kõrgem 0,029 võrra Märkimisväärne erinevus puudub

Leiti, et eraldamiskomplekt 2 ja komplekt 3 on suurendanud toetavaid lugemeid, nii et fusioonide ja splaiisvariantide avastamise tõenäosus LoD lähedal on eraldamiskomplekti valiku tõttu suurem.

Tabel 45 Eralduskomplekti mõju variantide avastamisele

Variandi tüüp (üksused)	Variantide avastamine (keskmine erinevus võrreldes komplektiga 1)
DNA väikesed variandid (VAF)	Ei ole tehniliselt märkimisväärne Sihtvariandid: komplektidevaheline varieeruvus oli jääkväärtuse suhtes väike Sihtimata variandid: Esimese kahe VAF-bini puhul olulisi erinevusi ei ole. Statilistilise olulisuse täheldamisel puudub oluline erinevus.
TMB (mutatsioon megabaasi kohta)	Ei ole tehniliselt oluline, komplektivaheline erinevus oli jäägi suhtes väike
MSI (ebastabiilsete kohtade %)	Komplekt 3, mis on madalam 1,9% võrra, ebastabiilsed kohad
Geeniamplifikatsioonid (kordsuse muutus)	Komplekt 2 (0,06) ja komplekt 3 (0,08) suurema kordsuse muutusega
Fusion Supporting Reads (Fusiooni toetavad lugemid)	Komplektis 2 oli toetavate lugemite kasv 51% ja komplektis 3 oli see 23%
Splaiisvariandid (toetavad lugemid)	Komplektis 2 ja komplektis 3 oli toetavate lugemite kasv 48%

Segavad ained

Hinnati võimalike endogeensete ja eksogeensete ainete mõju TSO Comprehensive (EU) analüüsi toimivusele. Endogeensed ained (melaniin ja hemoglobiin) lisati proovidesse nukleiinhapete eraldamisprotsessi ajal. Eksogeensed ained (etanol, ksüleen ja proteinaas K) olid olemas nukleiinhapete eraldamisprotsessi ajal ning samuti lisati neid puhastatud nukleiinhapetesse enne teekide valmistamist. Kui sekkumist täheldati ogastatud

proteinaas K-ga, hinnati ka proteinaas K kontsentratsioonide suurenemist eraldamisprotsessi ajal. Teegi ettevalmistamise ajal lisati liigselt indekspraimereid (15% ja 30%). Kui indekspraimerid välja arvatud, lisati FFPE proovidele aineid ajast, rinnast, käärsoolest, kopsust, medullaarsest kilpnäärmest, NSCLC-st, munasarjadest, eesnäärmest, süljest, nahast, pehmetest kudedest ja kilpnäärme koest – DNA analüüsiks eraldati kaheksa proovi ja RNA analüüsiks eraldati 13. Indekspraimerite puhul kasutati DNA analüüsiks kuut FFPE proovi kolmest erinevast koetüübist (kilpnääre, põis, käärsool) ja viit FFPE proovi neljast erinevast koetüübist (kops, kilpnääre, käärsool, rind). Iga 16 ainulaadse proovi jaoks oli olemas rikastamata endogeenne kontroll ja puhver- või veega rikastatud eksogeenne kontroll. Nekroosi mõju hinnati aju-, käärsoole- ja kopsukoest eraldi võetud kaheksal FFPE proovil. Iga nekroosiproovi puhul kasutati makrodissekteeritud nekroosita kontrollmaterjali. Kõigi segavate ainete puhul analüüsiti TSO Comprehensive (EU) analüüsiga nelja kordust iga proovi kohta ning võrreldi vastavate kontrolltingimustega DNA väikeste variantide, geeniamplifikatsioonide, RNA fusioonide ja RNA splaissvariantide avastamiseks ning MSI oleku ja TMB skoori määramiseks. Kaasati nii CDx-i kui ka kasvaja profileerimise variandid.

DNA variandi avastamine

Melaniin (0,2 µg/ml), hemoglobiin (2 mg/ml), etanool (5%), proteinaas K (0,04 mg/ml nukleinhappes) ja ksüleen (0,0001%) ei avalda TMB skoorile, MSI olekule, DNA väikestele variantidele ega geeniamplifikatsioonidele segavat mõju.

RNA variandi avastamine

Andmete põhjal ei mõjuta melaniin (0,2 µg/ml), etanool (5%) ja ksüleen (0,0001%) RNA fusioonide ega splaissvariantide avastamist. Hemoglobiin (2 mg/ml) häiris (vähendatud tugilugemid) kolme erineva splaissvariandiga MET-geenis. Splaissvarianti AR-geenis (kolm erinevat proovi) ja ühte EGFR-geenis (üks proov) ei mõjutanud. Kui labor kasutab analüüsiga RNA-d, tuleb lõikude hankimisel koeplikist vältida või minimeerida hemoglobiiniga kude.

Proteinaas K (0,04 mg/ml nukleinhappes) häiris RNA fusioone ja splaissvariante. Proteinaas K-d testiti ekstraheerimisprotsessi ajal annustes 2,6 mg/ml ja 5,2 mg/ml, mis on 2x ja 4x standardkontsentratsioon kaubanduslikult saadaolevas komplektis. Fusioone inhibeeriti 4x juures, kuid mitte 2x proteinaas K puhul. Splaissvariante inhibeeriti 2x proteinaas K juures. Proteinaas K või samaväärset ensüümi ei tohi eraldamise ajal eralduskomplektis olevast standardsest kontsentratsioonist suurendada.

Splaissvariant, mis toetab lugemeid, väheneb 30% liigsete indekspraimerite puhul, kuid mitte liigse 15% puhul.

Nekroos

Nekrootilise koe olemasolu kuni 70% ulatuses ei avaldanud TMB skoorile, MSI olekule ega väikestele DNA variantidele segavat mõju. RNA variantide (toetavad lugemid) ja geeniamplifikatsiooni (kordse muutuse) tuvastamist vähendati proovides, mille koepiirkonnas oli vastavalt $\geq 25\%$ ja $\geq 23\%$ (alati) nekrootiline sisaldus. Kui proovilõigud sisaldavad kogu koepiirkonnas $\geq 23\%$ nekroosi, tuleb nekrootiline kude makrodissekteerida.

Stabiilsus

Stabiilsus reaalajas

Reaalaja stabiilsuse abil määrati kindlaks analüüsikomplekti TSO Comprehensive (EU) kõlblikkusaeg tooteetiketi kohasel säilitamisel. Uuringu ülesehitus põhines kolme reaktiivipartii testimisel ja kasutas CLSI EP25-A-s kirjeldatud klassikalise stabiilsuse uuringu ülesehitust. Komplektid säilitati lõplikus komplekteeritud konfiguratsioonis kogu uuringu vältel tooteetiketil määratletud säilitamistingimustes. Külmutatud komplekti komponente säilitati temperatuuril -15 °C kuni -25 °C. Jahutatud komplekti komponente säilitati temperatuuril 2 °C kuni 8 °C.

Komplekte analüüsiti välimuse ja komplekti funktsionaalsete väljastamiskriteeriumide suhtes määratud ajapunktides. Samuti analüüsiti variantide avastamise ja proovi kvaliteedikontrolli mõõdikute suundumusi kvaliteedikontrolli kontrollmaterjali puhul. Iga reaktiivi puhul määrati kindlaks kõlblikkusaeg. Aegumiskuupäevad on määratud tootmiskuupäeva ja kõlblikkusaja põhjal. Komplekti aegumiskuupäev on määratud kõige varem aeguva reaktiivi põhjal.

Komplekti kasutusaegne stabiilsus

TSO Comprehensive (EU) analüüsi kasutusaegset stabiilsust hinnati standardsetes kasutustingimustes kogu kõlblikkusaja jooksul, et kontrollida komplekti mitmekordset kasutamist. Reaktiivikomplektile rakendati mitu külmutus-/sulatustsüklit ja seda analüüsiti komplekti kuni nelja kasutuskorra kontrollimiseks. Peale selle valmistati kaheksa RNA ja kaheksa DNA teeki kokku kolm korda, et katsetada toetatud teekide maksimaalset arvu (24 DNA ja 24 RNA teeki komplekti kohta). Komplekt vastas kõigile funktsionaalsetele väljastamiskriteeriumidele kõigi külmutus-/sulatustsüklite ja analüüsitud ajapunktide puhul. Selleks et hinnata komplekti kasutusaegse analüüsi mõju variantide avastamisele, analüüsiti FFPE proove reaktiividega vanuses ≥ 25 kuud. Sihitud variantide kvalitatiivne analüüs näitas, et kasutusaegsed sündmused ei mõjutanud variantide avastamist.

Nukleiinhappe stabiilsus

Nukleiinhapete (DNA ja RNA) stabiilsust ja nendega seotud kvantifitseerimist kasutamiseks analüüsiga TSO Comprehensive (EU) hinnati mitmest koetüübist võetud FFPE-proovide abil. FFPE plokid lõigati sektsioonideks ja kõik nukleiinhapped eraldati korraga. Eraldatud nukleiinhape segati põhjalikult, kvantifitseeriti, kontrolliti nukleiinhappe kvaliteedi suhtes ja jaotati kaheks ühekordse katsuti komplektiks, mis külmutati kaheks ajapunktiks: T0 kontroll (algase) ja T1 test (≥ 28 päeva). Kogu ekstraheeritud RNA-d säilitati temperatuuril -85 °C kuni -65 °C ja kogu ekstraheeritud DNA-d säilitati temperatuuril -25 °C kuni -15 °C näidatud ajaperioodi jooksul ning seejärel töödeldi analüüsiga TSO Comprehensive (EU) mitme replikaadi ja operaatori vahel. T1 analüüsitungimust võrreldi MSI staatuse, TMB skoori, geeniamplifikatsioonide, DNA väikeste variantide, RNA fusioonide ja RNA splaissvariantide kontrolliga. Andmed näitavad, et nukleiinhapped ja nendega seotud kvantitatsioon analüüsis TSO Comprehensive (EU) kasutamiseks on stabiilsed kuni 28 päeva, kui neid säilitatakse soovitataval temperatuuril (RNA temperatuuril -85 °C kuni -65 °C ja DNA temperatuuril -25 °C kuni -15 °C).

Teekide stabiilsus

Analüüsi iga kuut ohutut peatumispunkti kasutavate teekide stabiilsust (vt Tabel 5) hinnati mitme koetüübi FFPE proovidega. Kontrollteegid (T0, peatumispunktid puuduvad) sekveneeriti kohe töövoo lõpus. Samade teekide alikvoote hoiti peatumispunktides temperatuuril -25 °C kuni -15 °C (T1), et toetada Tabel 5 loetletud päevi. T1 võrreldi T0-ga DNA väikeste variantide, TMB, geeniamplifikatsioonide, MSI, RNA fusioonide ja RNA splaissvariantide puhul CDx-i ja kasvaja profileerimise variantidega. Andmed näitavad, et analüüsist TSO Comprehensive (EU) genereeritud teegid on stabiilsed vastavalt kasutusjuhendile.

Alusklaasile asetatud FFPE koe stabiilsus

Analüüsis TSO Comprehensive (EU) kasutamiseks mõeldud alusklaasile asetatud FFPE kudede stabiilsuse hindamiseks seksioneeriti FFPE plokid (5 µm lõigud) paljudest kordumatutest proovidest, asetati alusklaasidele ja säilitati toatemperatuuril (22 °C) 2 ajapunkti jooksul. RNA ekstraheeriti ja hoiustati temperatuuril -65 °C kuni -85 °C ning DNA ekstraheeriti ja hoiustati temperatuuril -15 °C kuni -25 °C vähem kui 1 nädal enne testimist. Nukleiinhappe materjal kvantifitseeriti ja seejärel töödeldi analüüsiga TSO Comprehensive (EU) 24 tunni jooksul iga ajapunkti kohta. Igas ajapunktis analüüsiti TSO Comprehensive (EU) analüüsiga mitut replikaati ja operaatorit proovi kohta ning võrreldi T0 ajapunktiga MSI, TMB, geeniamplifikatsioonide, DNA väikeste variantide, RNA fusioonide ja RNA splaissvariantide suhtes, sealhulgas CDx-i ja kasvaja profileerimise variandid. Variantide nimetamist hinnati ja see vastas kõigile vastuvõtukriteeriumidele, mis näitab, et analüüsiga TSO Comprehensive (EU) kasutatavad objektiklaasile paigaldatud FFPE koed on toatemperatuuril stabiilsed kuni 4 nädalat (28 päeva). Märgitakse, et MSI teegi kvaliteedikontrolli kehtivuse määra 10% vähenemine tuvastati operaatori ja säilitusaja kombinatsiooni tõttu 4 nädala (28 päeva) järel. RNA fusioonide ja splaissvariantide tugilugemite vähenemine pärast 4-nädalast (28 päeva) alustel säilitamist oli ligikaudu 29%.

Nukleiinhapete sisendmahu tiitrimise kaitseriba

Hinnati nukleiinhapete sisendmahu analüüsile TSO Comprehensive (EU), analüüsides DNA-d 33 FFPE proovist 17 koetüübilt sisendmahu tasemetel vahemikus 10 ng kuni 500 ng, ning RNA-d 5 FFPE proovist 5 koetüübilt sisendmahu tasemete vahemikus 10 ng kuni 85 ng. Hinnati teegi kvaliteedikontrolli mõõdikuid, mis osutusid proovist sõltuvaks. DNA tulemused näitasid, et mõned, kuid mitte kõik DNA-proovi kvaliteedikontrolli mõõdikud reageerisid suurenenud sisendmahule üle 40 ng nimisendmahu.

- MEDIAN_INSERT_SIZE ei reageerinud sisendmahule üle 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE näitas sisendmahu suurenemisega positiivset korrelatsiooni.
- PCT_EXON_50X suurenes sisendmahu suurenemisel kuni 80 ng-ni.
- USABLE_MSI_SITES suurenes koos sisendmahu suurenemisega. Mõned proovid vähem kui 40 mõõdikuga USABLE_MSI_SITES mahul 40 ng vastasid kõrgema sisendmahu spetsifikatsioonile, mis võimaldaks arvutada MSI skoori.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET suurenes koos sisendmahu suurenemisega.
- Sisendmahu suurendamine suurendab mõõdikut COVERAGE_MAD ülemise spetsifikatsioonipiiri suunas.

RNA-proovi kvaliteedikontrolli mõõdikud suurenesid (MEDIAN_INSERT_SIZE ja TOTAL_ON_TARGET_READS) või vähenesid (MEDIAN_CV_GENE_500X) mahult 10 ng mahule 40 ng, kuid üldiselt ei muutunud sisendmahtude 40 ng ja 85 ng vahel.

Kriitiline väärtus

Valepositiivsete (kõigist eeldatud negatiivsetest tulemustest) protsenti hinnati FFPE terve või healoomulise kõrvalasuva koe abil, mis ei tohiks sisaldada DNA väikeste variantide somaatilisi variante, geeniamplifikatsioone, MSI-d, RNA fusioone ega RNA splaissvariante. TMB-ga ei analüüsitud valepositiivseid tulemusi, kuna puudub kliiniline piirväärtus. Kaks kasutajat analüüsisid kuut DNA ja kuut RNA FFPE-proovi kaks korda kolme päeva jooksul kahe reaktiivipartiiga. Proovide alamkogum lisati uuesti kogumisse ja sekveneeriti uuesti ainult 3 × DNA ja ainult 3 × RNA kujul, et hinnata valepositiivseid selle seadmega toetatud mitme multiplekskonfiguratsiooniga. Lisaks analüüsisid kaks kasutajat kaks korda 30 täiendavat RNA-proovi, mida töödeldi ühe reaktiivipartiiga. Kokku oli iga varianditüübi kohta 168 võimalikku tähendust DNA puhul ja 228 tähendust RNA puhul, mida vähendasid kehtetud teegid. Valepositiivsete protsent arvutati geeni tasemel amplifikatsioonide jaoks ja positsiooni tasemel (umbes 1,9 miljonit positsiooni) DNA väikeste variantide jaoks. DNA varianditüüpide valepositiivsete protsent on näidatud Tabel 46. TSO Comprehensive (EU) puuduvad CDx-i (1. tase) väited DNA väikeste variantide kohta, nii et 1. taseme kohta ei saa esitada DNA väikeste variantide valepositiivseid tulemusi. TSO Comprehensive (EU) teadmusbaas tuvastas 271 valepositiivset tulemust. Ükski valepositiivne tulemus ei olnud kliiniliselt oluline (2. tase). 168 vaatlusest neljas vaatluses oli 3. tasemel 4 (2,4%) valepositiivset tulemust, mis tulenesid 2 variandist. RNA fusioonide ja splaissvariantide valepositiivsete protsent oli 0%, nagu on näha Tabel 47.

Tabel 46 Valepositiivsed DNA variandi tüübi järgi

Variandi tüüp	Valepositiivsed
Geeniamplifikatsioonid	0% (0/9912)
DNA väikesed variandid	0,0001% (271/295 801 567)
MSI	0% (0/156)
TMB	Ei kohaldata*

* Valepositiivseid ei kohaldata, sest TMB on esitatud skoorina ja sellel puudub kvalitatiivne tulemus.

Tabel 47 Valepositiivsete määr RNA varianditüübi alusel

Variandi tüüp	Valepositiivsed
Fusioon	0% (0/227)
Splaisvariant	0% (0/227)

Avastamispriir

TSO Comprehensive (EU) analüüsi avastamispriiri hindamiseks viidi läbi kaks uuringut. 1. uuringus hinnati RET-i DNA väikesi variante, RET-i fusioone ja NTRK1–3 fusioone. 2. uuringus hinnati muid kasvaja profiili määramise variante.

1. uuring

Määrati kindlaks DNA väikeste variantide NTRK1, NTRK3 ja RET ning fusioonide NTRK1–3 ja RET avastamispriir (LoD). LoD on madalaim analüüdi väärtus (näiteks variandi alleelisagedus või toetavad lugemid), mida saab järjepidevalt avastada (95% avastamispriir või II tüüpi viga 5%). Uuringus kasutati FFPE kudesid DNA väikeste variantidega RET (kilpnäärme medullaarne vähk), fusioone RET (kilpnäärme papillaarne vähk, atüüpiline Spitz neevus) ja fusioone NTRK1–3 (madala klassi glioom, multiformne glioblastoom, müofibroplastiline sarkoom, sarkoom, sekretoorne rinnavähk, käärsoolevähk), samuti FFPE-ga töödeldud rakuliini DNA väikeste variantidega NTRK1 ja NTRK3. Iga proov lahjendati vähemalt viiele analüüsitasele (vahemikus ligikaudu 0,01–0,10 VAF DNA väikeste variantide puhul ja ligikaudu 2–25 toetavate lugemitega fusioonide puhul). Kolm kasutajat tegid kolme sekveneerimisseadet kasutades teegi valmistamiseks kolmel mittejärjestikusel päeval kaks korda iga analüüsitase puhul iga partii iga variandi kohta kokku 18 vaatlust. Analüüsi kaht reaktiivpartiid.

DNA variantide puhul analüüsi kaht partiid sõltumatult, kasutades probit-regressiooni või tulemusmäära meetodit (madalaim analüüsitase tulemusmääraga (punkthinnanguga) $\geq 95\%$), et määrata kindlaks iga variandi LoD partii kohta. Suuremat LoD-d kahe reaktiivpartii lõikes arvestati variandi avastamispriirina (Tabel 48).

RNA fusioonide puhul kasutati iga fusiooni geeni LoD väärtuste määramiseks FFPE rakuliine. Seejärel kontrollisid kolm kasutajat kolmel seadmel kolme reaktiivpartiiga kahel teegi valmistamisel LoD-sid FFPE kudedega, tehes 54 vaatlust variandi kohta FFPE rakuliinidega määratud LoD lähedal. Iga fusiooni puhul esitatud avastamispriirid (Tabel 49) on madalaimad keskmised toetavad lugemid, mis saavutasid tulemusmäära (punkthinnangu) $\geq 95\%$.

Tabel 48 DNA väikeste variantide NTRK1, NTRK3 ja RET avastamispriir

Marker	Chr ¹	Position (Asend)	Võrdlus	Alternatiiv	Avastamispriir (variandi alleelisagedus)
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

Marker	Chr ¹	Position (Asend)	Võrdlus	Alternatiiv	Avastamispiir (variandi alleelisagedus)
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (deletsioon) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = kromosoom

² Neid DNA variante analüüsiti probit-regressiooniga, teisi DNA variante analüüsiti tulemusmäära meetodil.

Tabel 49 Fusioonide NTRK ja RET avastamispiir

Geen	Fusioon	Avastamispiir (toetavad lugemid)
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

2. uuring

Hinnati TSO Comprehensive (EU) analüüsiga teatatud variantide kasvaja profiili määramise avastamispiire (LoD). LoD on madalaim analüüdi väärtus (variandi alleelisagedus, kordsuse muutus või toetavad lugemid), mida saab järjepidevalt avastada (95% tulemusmäär või II tüüpi viga 5%). FFPE proovid variante sisaldavast 17 koetüübist lahjendati mitmele analüüsisasemele. Kaks kasutajat tegid iga taseme kohta kuus vaatlust, kasutades erinevat reaktiivipartiid ja seadet.

DNA variandid

Kindlaks määrati 10 DNA väikese variandi klassi (kokku 25 varianti) LoD-d ja kaks DNA geeniamplifikatsiooni (ERBB2 ja MET), mis on vahemikena kokku võetud Tabel 50. Lisatud on ka RET variandid uuringust 1 LoD. Kolmest insertioonist kahe, mis olid suuremad kui 5 aluspaari (bp), LoD-d olid 0,034 ja 0,036 VAF ning kolmanda LoD oli 0,215 VAF. Viimane oli insertioon madala kompleksusega piirkonnast, kus insertioon lisab täiendavaid kordusi, mõjutab joondust ja nõuab järjepidevaks avastamiseks rohkem lugemeid. Seetõttu võivad mõned madala kompleksusega genoomikontekstid mõjutada > 5 bp insertioonide avastamist.

Tabel 50 DNA väikeste variantide ja geeniamplifikatsioonide avastamispiir

Tüüp (LoD mõõtetühik)	Variandi klass / genoomikontekst	Variantide arv	Vahemik (VAF)
DNA väikesed variandid (variandi alleelisagedus)	SNV-d	5	0,016–0,064
	MNV-d	3	0,022–0,048
	Insertsioon (1–2 bp) homopolümeeri korduste lähedal	2	0,086–0,104
	Insertsioon (1–2 bp) dinukleotiidi korduste lähedal	2	0,038–0,051
	Insertsioon (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Insertsioon (> 5 bp ja kuni 25 bp)	3	0,034–0,215
	Deletsioon (1–2 bp) homopolümeeri korduste lähedal	2	0,094–0,100
	Deletsioon (1–2 bp) dinukleotiidi korduste lähedal	2	0,033–0,070
	Deletsioon (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Deletsioon (> 5 ja kuni 25 bp)	2	0,047–0,055
Geeniamplifikatsioonid (kordsuse muutus)	Geeni alusel (ERBB2, MET)	2	1,539; 1,570

Sihtimata variantide analüüs viidi läbi 1. uuringu proovidest, millel oli vähemalt viis analüüsitaset. Iga mittesihitud varianti analüüsiti individuaalselt ja LoD hinnati ainult variantide puhul, mille vähemalt üks tase on > 0% ja ≤ 95% tabamismäär ning vähemalt üks tase ≥ 95% tabamismääraga. Tabel 51 on näidatud protsentiilid koos minimaalsete ja maksimaalsete LoD-dega, mida klasside alusel mittesihitavate variantide puhul täheldati. Sihtimata variandid pakuvad klassiti rohkem variante, kui testiti 2. uuringus ja on kooskõlas Tabel 50 toodud LoD vahemikega.

Tabel 51 Tuvastamispiiride kokkuvõtte mittetariifsete variantide klassi alusel (1. uuringust)

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

Fusioonid

LoD määrati kindlaks 19 fusiooni puhul, võttes arvesse 20 geeni TSO Comprehensive (EU) analüüsi paneelil, mis jäid toetavate lugemite vahemikku 9–31,3 (Tabel 52). Teises uuringus analüüsiti kolme täiendavat geeni (NTRK1–3). RET-geeni analüüsiti nii selles kui ka teises uuringus. 16 fusioonil, mille LoD määrati, olid andmed kooskõlas 16 toetava näidu üldise LoD-ga, kasutades kahepoolset 95% ülemist usalduspiiri (UCL). Kahe fusiooni LoD-de toetavad lugemid olid 24,7 ja 31,3, mis ei olnud üldise LoD-ga kooskõlas.

Fusiooni FGFR2-SRPK2 puhul, mille LoD toetav lugem oli 24,7, esines TSO Comprehensive (EU) analüüsi tarkvara märkuse kohaselt murdepunktis korduvalt kattuvaid piirkondi. Murdepunktiga korduvatel piirkondadel on tavalised madalamad tõendustasemed, kuna lugemid võivad sobituda geeni muude piirkondadega või jääda joondamata. Lisaks muudavad korduvad piirkonnad koostamisprotsessi (mida kasutatakse fusioonijärjestuste tuvastamiseks) keerulisemaks ja nõuavad õige järjestuse loomiseks täiendavaid tõendeid. SEPT14-EGFR on teine näide fusioonist, mille murdepunktis on homoloogne järjestus.

Fusioonil BCL2-IGHJ5, mille LoD toetav lugem oli 31,3, oli väga lühike geen (IGHJ5) ja murdepunkt eksoni alguse lähedal, mis nõudis vahedega lühikesi joondusi. Seetõttu oli järjepidevaks avastamiseks vaja rohkem lugemeid.

Tabel 52 Fusioonide avastamispiir

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

Fusioon	Geeni A murdepunkt	Geeni B murdepunkt	LoD	Üldine LoD
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	Jah
CD74-ROS1; GOPC	149784243	117645578	9,2	Jah
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	Jah
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	Jah
DHX8; ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	Jah
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	Jah
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	Ei
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	Jah

Splaisvariandid

Kahe RNA splaisvariandi – MET ja EGFR – LoD oli vastavalt 18,7 ja 16,7 toetavat lugemit.

Kasvajasisaldus

Uuringu tulemused annavad soovitusi kliiniliste proovimaterjalide kasvajasisalduse kohta. Üldjuhul kehtib reegel, et mida suurem on kasvajasisaldus, seda tugevam on variantide signaal (VAF, kordse muutus või toetavad lugemid) kasvajas. Minimaalse kasvajasisalduse soovitusel põhinevad järgmistel vaatlustel. DNA väikeste variantide LoD väärtused pole suuremad kui 0,104 VAF (v.a insertiooni TP53 puhul). Kasvajas juhtmutatsioonide avastamiseks (variandi alleelisagedus 0,50) on soovituslik 20% tuumorisaldus, nii et nende mutatsioonide VAF oleks 0,10 ja need oleksid LoD tasemel või sellest kõrgemal. 20% kasvajasisalduse korral avastataks 5,5 kordsuse muutuseni (11 koopiat) amplifitseeritud geenid 1,8 kordsuse muutusega avastamiskiirga põhjal järjepidevalt. 20% kasvajasisalduse korral avastataks 74 toetava lugemiga fusioonid 14,7 toetava lugemiga avastamiskiirga põhjal järjepidevalt.

Korratavus

TSO Comprehensive (EU) analüüsi korratavuse hindamiseks viidi läbi kaks uuringut. 1. uuringus hinnati lisaks NTRK ja RET fusioonivariantidele ka RET DNA väikesi variante. 2. uuringus hinnati täiendavaid kasvaja profiili määramise variante.

1. uuring

See uuring tehti TSO Comprehensive (EU) analüüsi korratavuse hindamiseks kolmes analüüsiskohas (üks sisemine, kaks välist) kahe kasutajaga koha kohta kolmel mittejärjestikusel analüüsipäeval kahe käitusesisese kordusega. Analüüsiks kasutati korratavuse paneeli, sh DNA-proove, mis sisaldasid spetsiifilisi teadaolevaid RET DNA väikeseid variante, ning RNA-proove, mis sisaldasid spetsiifilisi teadaolevaid fusioonivariante NTRK1–3 ja RET formaliniga fikseeritud ja parafiini sisestatud (FFPE) koeproovimaterjalidest ning rakuliinidest. Paneel sisaldas DNA ja RNA paneeliliikmeid nii madala kui ka kõrge varianditasemega ning iga

variandiklassi korral olid madala ja kõrge tasemega paneeliliikmete arvud samad. Kõrge tasemega paneeliliikmeid sihti ligikaudu 2 kuni 3 korda LoD-st kõrgemal ja madala tasemega paneeliliikmeid umbes LoD juures. Igas uuringukohas analüüsis iga kasutaja paneeliliikmeid kaks korda kolmes korduses, tehes kuus vaatlust iga sihtkoha ja paneeliliikme kohta. Kõigi kolme uuringukoha peale kokku tehti 36 vaatlust iga paneeliliikme kohta (3 kohta/seadet × 2 kasutajat × 2 käitusesisest kordust × 3 alguspäeva).

Sihitud DNA väikeste variantide ja sihitud RNA fusioonivariantide PPC-d ja PNC-d kõrgel tasemel määrati kindlaks esmaste tulemusnäitajadena. Sihitud DNA väikeste variantide ja sihitud RNA fusioonivariantide PPC-d ja PNC-d madalal tasemel arvutati teiseste tulemusnäitajadena. Kõigi tulemusnäitajatega seotud kahepoolsed 95% usaldusvahemikud (CI) arvutati Wilsoni skoori meetodil. Sihitud kõrge taseme paneeliliikmete PPC ja PNC hindamiseks (95% usaldusvahemikuga) tehti esmased analüüsid, kombineerides asjaomase sihtmärgi TSO Comprehensive (EU) analüüsi vaatlused paneeliliikmete rühmas, mis tähistavad kohaldatavat variandi klassi (näiteks DNA väikesed variandid ja RNA fusioonid), kõigi analüüsimiskohtade/seadmete, kasutajate ja käituste lõikes. Iga sihitud variandi kohta kombineeriti PNC arvutamiseks TSO Comprehensive (EU) analüüsi sama varianditüübiga kõrge tasemega sihitud, kuid teisi variante sisaldavate paneeliliikmete vaatlused, määratuna enamusreegli järgi. Madala tasemega sihitud paneeliliikmete üldine PPC ja PNC määrati kindlaks samamoodi.

RET DNA väikesed variandid

Kõrge tasemega DNA väikeste variantide paneeliliikmete üldine PPC oli 100,0% (207/207; 95% CI: 98,2% kuni 100,0%) ([Tabel 53](#)). Kõrge tasemega DNA väikeste variantide paneeliliikmete üldine PNC oli 100,0% (1035/1035; 95% CI: 99,6% kuni 100,0%) ([Tabel 54](#)). Madala tasemega sihitud DNA väikeste variantide paneeliliikmete üldine PPC oli 99,1% (210/212; 95% CI: 96,6% kuni 99,7%) ja üldine PNC oli 100,0% (1026/1026; 95% CI: 99,6% kuni 100,0%).

Tabel 53 TSO Comprehensive (EU) analüüsi PPC RET DNA väikeste variantide avastamiseks kõrge ja madala tasemega sihitud paneeliliikmetest

Variandi tase	Variandi tüüp	Sihitud variant (nukleotiid)	Sihitud variant (aminohape)	Arv	Keskmine 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)
	Deletsioon	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6; 100,0)
	Insertsioon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4; 100,0)
	Kõik väikesed DNA-d kõrged variandid	Kõik väikesed DNA-d kõrged variandid	Kõik väikesed DNA-d kõrged variandid	207	N/A 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)
	Deletsioon	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8; 100,0)
	Insertsioon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4; 100,0)
	Kõik väikesed DNA-d madalad variandid	Kõik väikesed DNA-d madalad variandid	Kõik väikesed DNA-d madalad variandid	212	N/A ¹	99,1 (210/212)	(96,6; 99,7)

¹ Lühendid: N/A, pole kohaldatav; VAF, variandi alleeli esinemissagedus.² Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Tabel 54 TSO Comprehensive (EU) analüüsi PNC RET DNA väikeste variantide avastamiseks kõrge ja madala tasemega sihitud paneeliliikmetest

Variandi tase	Variandi tüüp	Sihitud variant (nukleotiid)	Sihitud variant (aminohape)	Arv 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)
	Deletsioon	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8; 100,0)
	Insertsioon	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8; 100,0)
	Kõik väikesed DNA-d kõrged variandid	Kõik väikesed DNA-d kõrged variandid	Kõik väikesed DNA-d kõrged variandid	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)
	Deletsioon	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9; 100,0)
	Insertsioon	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9; 100,0)
	Kõik väikesed DNA-d madalad variandid	Kõik väikesed DNA-d madalad variandid	Kõik väikesed DNA-d madalad variandid	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6; 100,0)

¹ Kõigi vaatluste kogum paneeliliikmete ja variantide kombinatsioonidest, mille puhul suurem osa vastetest on negatiivne, st sihitud variandid, mis sisaldavad fusioone vähem kui 50% positiivsete vastetega.

² Wilsoni skoori meetodil arvutatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Tabel 55 on esitatud variandi alleeli esinemissageduste (VAF-id) komponentide varieeruvuse analüüs üle ligikaudu 36 vaatluse iga paneeliliikme kohta. Iga sihitud RET DNA väikese variandi kohta arvutati ning esitati standardhälve (standard deviation, SD) ja variatsioonikordaja (percent coefficient of variation, %CV; nii kokku kui ka iga allika korral).

Tabel 55 TSO Comprehensive (EU) analüüsi VAF-ide komponentide varieeruvuse analüüs sihitud DNA väikeste variantide paneeliliikmetest

Variandi tase	Variandi tüüp	Sihitud variant (nukleotiid)	Sihitud variant (aminohape)	Arv	Keskmine VAF	Koha SD (%CV)	Kasutaja SD (%CV)	Päeva SD (%CV)	Korduse SD (%CV)	Kogu 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)
	Deletsioon	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)
	Insertsioon	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)
	Deletsioon	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)
	Insertsioon	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8)	0,000 (0,0)	0,003 (9,1)	0,006 (15,9)	0,008 (22,9)

NTRK 1–3 ja RET-i fusioonid

Kõrge tasemega RNA fusioonipaneeli liikmete puhul oli üldine PPC 99,3% (285/287; 95% CI: 97,5% kuni 99,8%) (Tabel 56). PPC oli 100% kõigi kõrge tasemega paneeliliikme puhul peale paneeliliikme BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; 95% CI: 81,9% kuni 98,5%]). Kõrge tasemega RNA fusioonipaneeli liikmete üldine PNC oli 100,0% (1724/1724; 95% CI: 99,8% kuni 100,0%) (Tabel 57). Madala tasemega RNA fusioonipaneeli liikmete üldine PPC oli 95,4% (272/285; 95% CI: 92,3%, 97,3%) ja üldine PNC 100,0% (1851/1851; 95% CI: 99,8% kuni 100,0%).

Tabel 56 TSO Comprehensive (EU) analüüsi PPC fusioonide NTRK ja RET avastamiseks kõrge ja madala tasemega sihitud paneeliliikmetest

Variandi tase	Sihtud fusioon	Arv	Toetavate lugemite keskmine	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)
	Kõik kõrged fusioonid	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)
	Kõik madalad fusioonid	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3; 97,3)

* Wilsoni skoori meetodil arvutatud 95% kahepoolne usaldusvahemik (CI).

Tabel 57 TSO Comprehensive (EU) analüüsi PNC fusioonide NTRK ja RET avastamiseks kõrge ja madala tasemega mittesihitud paneeliliikmetest

Variandi tase	Sihitud fusioonid	Arv 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)
	Kõik kõrged fusioonid	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)
	Kõik madalad fusioonid	1851	100,0% (1851/1851)	(99,8; 100,0)

¹ Kõigi vaatluste kogum paneeliliikmete ja variantide kombinatsioonidest, mille puhul suurem osa vastetest on negatiivne, st sihitud variandid, mis sisaldavad fusioone vähem kui 50% positiivsete vastetega.

² Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik (CI).

Tabel 58 on näidatud toetavate lugemite komponentide varieeruvuse analüüs ligikaudu 36 vaatluse puhul igas sihitud fusioonis. Iga sihitud fusiooni kohta arvutati ja esitati SD ning %CV (kokku ja iga allika kohta).

Tabel 58 TSO Comprehensive (EU) analüüsi toetavate lugemite komponentide varieeruvuse analüüs sihitud RNA fusioonipaneeli liikmetest

Variandi tase	Fusioon	Arv	Toetavate lugemite keskmine	Koha SD (%CV)	Kasutaja SD (%CV)	Päeva SD (%CV)	Korduse SD (%CV)	Kogu 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)

2. uuring

Teine uuring viidi läbi TSO Comprehensive (EU) analüüsi korratavuse hindamiseks kolmes analüüsiskohas (kahes välises ja ühes sisemises) kahe kasutaja/seadmega iga koha kohta nelja (mittejärjestikuse) analüüsipäeva jooksul, kasutades kolme kordumatut reaktiivipartiid ja kaht sekveneerimiskäitust iga prooviteegi kohta.

Analüüsimisel kasutati 41 FFPE koeproovist ja 1 FFPE rakuliinist eraldatud DNA- ja RNA-proove (kusjuures kahe paneeliliikme loomiseks kasutati kummagi puhul 1 FFPE koeproovi ja FFPE rakuliini). Koeproovid hõlmasid järgmisi tüüpe: kusepõis, luu, aju, rind, käärsool, tühisool, neer, maks, kops, munasari, eesnääre, nahk, pehme kude, magu, kilpnääre ja emakas. Kokku analüüsiti 44 paneeliliiget, sh DNA väikeste variantidega (SNV-d, MNV-d, insertioonid ja deletsioonid) DNA paneeliliikmed, geeniamplifikatsioonid, erinevad TMB skoorid, kõrged MSI skoorid ning fusioonide ja splaissvariantide RNA paneeliliikmed. Enamikul paneeliliikmetel olid teadaolevad sihtvariandid tasemetel ligikaudu 2–3 korda kõrgemal variandikohasest avastamispiirist (~2–3 x LoD).

LoD on analüüdi kontsentratsioon, mille juures vaadeldud analüüsitulemused on positiivsed (variant avastatud TSO Comprehensive (EU) analüüsi piirväärtuse suhtes) $\geq 95\%$ ajast. Keskmised vaadeldud varianditasemed

kategoriseeriti järgmiselt: ligikaudu $< 2 \times \text{LoD}$ (vaadeldud varianditasemed $< 1,5 \times \text{LoD}$ juures), $\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$ (vaadeldud varianditasemed $1,5 \times \text{LoD}$ kuni $3,4 \times \text{LoD}$) ja ligikaudu $> 3 \times \text{LoD}$ (vaadeldud varianditasemed $> 3,4 \times \text{LoD}$).

PPC arvutamiseks DNA väikeste variantide, geeniamplifikatsioonide, kõrge MSI-ga (MSI-High) ja RNA variantide puhul ühendati vaatlused sekveneerimiskäituste ja analüüsimiskohtade lõikes. PNC arvutati DNA väikeste variantide, geeniamplifikatsioonide ja RNA variantide puhul sarnaselt. Iga teadaoleva sihtvariandi puhul kombineeriti PNC arvutamiseks TSO Comprehensive (EU) analüüsi sama varianditüübiga, kuid teisi variante sisaldavate paneeliliikmete vaatlused, mida ei saadud samast lähteproovimaterjalist ja mis ei vastanud selle variandi enamusreeglile ($< 50\%$ vastetest olid positiivsed), kõigi analüüsimiskohtade, kasutajate/seadmete, päevade, reaktiivipartiide ja sekveneerimiskäituste lõikes. Kahepoolne 95% usaldusvahemik (CI) arvutati Wilsoni skoori meetodil.

DNA väikesed variandid

Tabel 59 on näidatud PPC-d sihitud DNA väikeste variantide puhul. PPC jäi vahemikku 91,3% BRAF SNV puhul kuni 100% enamiku DNA väikeste variantide puhul.

Tabel 59 TSO Comprehensive (EU) analüüsi PPC DNA väikeste variantide avastamiseks ühendatud sihitud paneeliliikmetest

Vaadeldud varianditase ¹	Variandi tüüp	Sihitud variant (nukleotiid)	Sihitud variant (aminohape)	Keskmine VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	DELETIOON	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9; 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	DELETIOON	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2; 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	INSERTIOON	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3; 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	INSERTIOON	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
$< 2 \times \text{LoD}$	INSERTIOON	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0; 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7; 96,6)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	DELETIOON	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)

Vaadeldud varianditase ¹	Variandi tüüp	Sihitud variant (nukleotiid)	Sihitud variant (aminohape)	Keskmine VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
~2–3 × LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8; 100,0)
~2–3 × LoD	DELETIOON	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0; 100,0)
~2–3 × LoD	INSERTIOON	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4; 100,0)
~2–3 × LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4; 100,0)
~2–3 × LoD	MNV	chr12_25398284_CC_ AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8; 100,0)
~2–3 × LoD	INSERTIOON	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
~2–3 × LoD	DELETIOON	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0; 100,0)
< 2 x LoD	INSERTIOON	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2; 100,0)
~2–3 × LoD	INSERTIOON	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)

¹ Variandi keskmise vaadeldud alleelisageduse põhjal arvutatud varianditase.

² Vaadeldud analüüsitulemuste põhjal arvutatud variandi keskmine alleelisagedus.

³ Wilsoni skoori meetodil arvutatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

PNC oli 100% kõigi DNA väikeste variantide lõikes.

Tabel 60 on näidatud VAF-i tulemuste komponentide varieeruvuse analüüs iga variatsiooniallika korral ning kogu varieeruvus kõigi paneeliliikmete seas koos sihitud DNA väikeste variantidega.

Tabel 60 VAF-i komponentide varieeruvuse analüüs sihitud DNA väikeste variantide puhul

Sihitud variant (nukleotiid)	Arv	Keskmine VAF	Koha SD (%CV)	Kasutaja SD (koht) (%CV)	Päeva SD (koht, kasutaja) (%CV)	Partii SD (%CV)	Analüüsi SD (%CV)	Kogu 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)

Kahe DNA väikese sihitud variandi puhul oli vaatluste arv komponentide varieeruvusmodeli sobitamiseks liiga väike. Neist kahest sihitud variandist oli üldine SD variandi chr1_27024001_C_CG puhul 0,027 ja variandi chr17_7578470_C_CGGGCGG puhul 0,001.

Geeniampifikatsioonid

Tabel 61 on näidatud sihitud geeniampifikatsioonide PPC-d. PPC oli MET-i puhul 100,0% ja ERBB2 puhul 100,0%.

Tabel 61 TSO Comprehensive (EU) analüüsi PPC geeniampifikatsioonide avastamiseks ühendatud sihitud paneeliliikmetest

Vaadeldud varianditase ¹	Sihitud variant	Keskmine vaadeldud kordsuse muutus ²	Positiivsete vastete protsent (%)	95% CI ³
~2–3 x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
~2–3 x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4; 100,0)

¹ Keskmise vaadeldud kordsuse muutuse põhjal arvutatud varianditase.

² Vaadeldud analüüsitulemuste põhjal arvutatud keskmine kordsuse muutus.

³ Wilsoni skoori meetodil arvutatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

PNC oli 100% kõigi geeniampifikatsioonide lõikes.

Tabel 62 on näidatud kordsuse muutuse tulemuste komponentide varieeruvuse analüüs iga variatsiooniallika puhul ning kogu varieeruvus kõigi paneeliliikmete seas koos sihitud geeniampifikatsioonidega.

Tabel 62 Kordsuse muutuse komponentide varieeruvuse analüüs sihitud geeniampifikatsioonide puhul

Sihitud variant	Arv	Keskmine kordsuse muutus	Koha SD (%CV)	Kasutaja SD (koht) (%CV)	Päeva SD (koht, kasutaja) (%CV)	Partii SD (%CV)	Analüüsi SD (%CV)	Kogu SD (%CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabel 63 on näidatud PPC-d sihitud MSI-High paneeliliikmete puhul. PPC-d oli 100% mõlema MSI-High paneeliliikmete puhul.

Tabel 63 TSO Comprehensive (EU) analüüsi PPC MSI-High oleku avastamiseks ühendatud sihitud paneeliliikmetest

Paneeliliige	MSI keskmine skoor ¹	Arv	Positiivsete vastete protsent (%)	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)
Kõik liikmed		68	100,0 (68/68)	(94,7; 100,0)

¹ Vaadeldud analüüsitulemuste põhjal arvatud keskmine vaadeldud MSI skoor.

² Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Tabel 64 on näidatud MSI skoori tulemuste komponentide varieeruvuse analüüs iga variatsiooniallika puhul ning kogu varieeruvus kõigi sihitud MSI-High olekuga paneeliliikmete seas.

Tabel 64 MSI skoori komponentide varieeruvuse analüüs sihitud MSI-High paneeliliikmete puhul

Paneeliliige	Arv	MSI keskmine skoor	Koha SD (%CV)	Kasutaja SD (koht) (%CV)	Päeva SD (koht, kasutaja) (%CV)	Partii SD (%CV)	Analüüsi SD (%CV)	Kogu 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

TMB skooride korratavuse hindamiseks viidi sihitud TMB paneeliliikmete, mis esindasid oodatud TMB skooride vahemikku, seas läbi skoori kvantitatiivne analüüs. **Tabel 65** on näidatud TMB skoori tulemuste komponentide varieeruvuse analüüs iga variatsiooniallika puhul ning kogu varieeruvus TMB paneeliliikmete seas. TMB skoori kogu SD oli ühe paneeliliikme puhul 1,0 (%CV = 13) (keskmine TMB skoor = 7,6) ja teise paneeliliikme puhul 1,1 (%CV = 2) (keskmine TMB skoor = 63,2).

Tabel 65 TMB skoori komponentide varieeruvuse analüüs sihitud TMB paneeliliikmete puhul

Paneeliliige*	Arv	TMB keskmine skoor	Koha SD (%CV)	Kasutaja SD (koht) (%CV)	Päeva SD (koht, kasutaja) (%CV)	Partii SD (%CV)	Analüüsi SD (%CV)	Kogu 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)

* Ühe TMB paneeliliikme puhul oli vaatluste arv komponentide varieeruvusmodeli sobitamiseks liiga väike (N = 2). Selle paneeliliikme üldine SD oli 1,7.

RNA variandid

Tabel 66 on näidatud PPC-d sihitud RNA variantide puhul. PPC jäi vahemikku 91,7% KIF5B-RET puhul kuni 100% enamiku RNA variantide puhul.

Tabel 66 Analüüsi TSO Comprehensive (EU) PPC RNA variantide avastamiseks ühendatud sihitud paneeliliikmetest

Vaadeldud varianditase ¹	Variandi tüüp	Sihitud variant	Toetavate lugemite keskmine ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
> 3 x LoD	Fusioon	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)
	Fusioon	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)
	Fusioon	CD74-ROS1; GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
	Fusioon	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)
	Fusioon	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
	Fusioon	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
	Fusioon	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
~2–3 x LoD	Fusioon	DHX8; ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)
	Fusioon	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)
	Fusioon	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)
	Fusioon	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
	Fusioon	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
	Fusioon	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
	Fusioon	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)
	Fusioon	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1; 99,6)
< 2 x LoD	Fusioon	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4; 96,7)
	Fusioon	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)
> 3 x LoD	Splaisvariant	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3; 100,0)
~2–3 x LoD	Splaisvariant	MET eksoni 14 vahelejäät	61,2	100,0 (48/48)	(92,6; 100,0)

¹ Keskmist vaadeldud toetavate lugemite põhjal arvutatud varianditase.

² Vaadeldud analüüsitulemuste põhjal arvutatud keskmised toetavad lugemid.

³ Wilsoni skoori meetodil arvutatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

PNC oli 100%-ga sihitud RNA variandi puhul peale fusiooni FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60% (984/988; 95% CI: 98,96% kuni 99,84%).

Tabel 67 on näidatud toetavate lugemite tulemuste komponentide varieeruvuse analüüs iga variatsiooniallika puhul ning kogu varieeruvus kõigi paneeliliikmete seas koos sihitud RNA variantidega.

Tabel 67 Toetavate lugemite komponentide varieeruvuse analüüs sihitud RNA variantide puhul

Sihitud variant	Arv	Toetavate lugemite keskmine	Koha SD (%CV)	Kasutaja SD (koht) (%CV)	Päeva SD (koht, kasutaja) (%CV)	Partii SD (%CV)	Analüüsi SD (%CV)	Kogu 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)
TMPPSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR VIII splaissvariant	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET eksoni 14 vahelejätku splaissvariant	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Laborisisene täpsus

TSO Comprehensive (EU) analüüsi laborisisese kordustäpsuse hindamiseks viidi läbi kaks uuringut. 1. uuringus hinnati fusioone NTRK ja RET ning DNA väikesi variante RET. 2. uuringus hinnati TMB-d ja MSI-d.

1. uuring

Laborisisest kordustäpsust hinnati fusioonide NTRK1–3 (madalama klassi glioom, multiformne glioblastoom, müofibroplastiline sarkoom, sekretoorne rinnavähk), fusioonide RET (kilpnäärmevähk ja nahakude tundmatu vähiga) ning DNA väikeste variantide RET (kilpnäärme medullaarne vähk) puhul näidatud vähkide FFPE kudedega. Igat proovi analüüsiti kahel varianditasemel: ~1× LoD (madal varianditase) ja ~2–3× LoD (kõrge

variantitase), v.a varianti CCDC6-RET sisaldava proovi puhul, mida analüüsiti ainult madalal variantitasemel. Kolm (3) kasutajat käitasid igat proovi igal analüüsitasemel kaks korda igal teegi valmistamisel. Iga kasutaja käivitas teegi valmistamise kolmel (3) mittejärjestikusel alguspäeval ja teostas sekveneerimise kolmel (3) määratud seadmel NextSeq 550Dx Instrument. Analüüsiti kolme (3) reaktiivipartiid, tehes iga taseme kohta 54 vaatlust. Mõnel tasemel oli kehtetute teekide tõttu vähem kui 54 vaatlust.

Kvalitatiivne analüüs

Variantide avastamise kvalitatiivset kooskõllalisust hinnati asjaomase variandi puhul eraldi kahel variantitasemel kõigi muutujate (kasutajad, reaktiivipartiid, seadmed, päevad ja kordused) vaatluste kogumist. Positiivsete vastete protsent (PPC) ja negatiivsete vastete protsent (PNC) ning asjaomased kahepoolsed 95% usaldusvahemikud (Wilsoni skoor) on kokku võetud Tabel 68 (DNA väikesed variandid) ja Tabel 69 (RNA fusioonid).

Kõrge variandi tasemel (~2–3x LoD) oli TSO Comprehensive (EU) analüüsi PPC ja PNC kõigi analüüsitud variantide puhul 100%.

Madalal variantitasemel (~1 × LoD), oli DNA väikeste variantide PPC vahemikus 83,3% kuni 98,1% ning RNA fusioonide PPC vahemikus 90,7% kuni 100%. Variantide puhul, mille PPC oli < 95%, olid keskmised VAF-id (RET C634Y ja RET D898_E901del) või toetavad lugemid (NCOA4-RET ja BCAN-NTRK1) allpool vastavat avastamispiiri. Madala variandi tasemel saavutati PNC 100% kõigi variantide puhul.

Tabel 68 Sihitud DNA variantide kvalitatiivsed tulemused

Variandi tase	Variant	Variandi tüüp	Keskmine 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	DELETIOON	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*	DELETIOON	0,056	98,1 (53/54) (90,2; 99,7)	100,0% (215/215) (98,2; 100,0)

Variandi tase	Variant	Variandi tüüp	Keskmine VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4; 100,0)	100,0 (192/192) (98,0; 100,0)
	RET D898_ E901del	DELETIOON	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*	DELETIOON	0,161	100,0 (32/32) (89,3; 100,0)	100,0 (214/214) (98,2; 100,0)

* Nukleotiidimuutused on loetletud iga variandi puhul jaotises „Avastamispäir“, v.a RET D631_L633delinsE, mille parameetrid on järgmised: kromosoom 10, positsioon 43609940, võrdlus ACGAGCT, alternatiiv A.

Tabel 69 Sihitud RNA fusioonide kvalitatiivsed tulemused

Variandi tase	Fusioon	Toetavate lugemite keskmine	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 (FFPE rakuliin)	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 (proov 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6; 98,0)	100,0 (430/430) (99,1; 100,0)
	KIF5B-RET (proov 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2; 99,0)	

Variandi tase	Fusioon	Toetavate lugemite keskmine	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 (FFPE rakuliin)	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	Ei kohaldu	Ei analüüsitud	100,0 (589/589) (99,4; 100,0)
	KIF5B-RET (proov 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4; 100,0)	100,0 (428/428) (99,1; 100,0)
	KIF5B-RET (proov 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2; 100,0)	

Kvantitatiivne analüüs

Viidi läbi komponentide varieeruvuse piiratud suurima tõepära (REML) analüüs, et hinnata aluseks oleva pideva muutuja koguvarieeruvust (VAF DNA väikeste variantide puhul ja toetavad lugemid RNA fusioonide puhul) ning kordustäpsuse komponente (standardhälve (SD), variatsioonikordaja (CV)) iga lähtemuutuja puhul (kasutajad, seadmed, päevad, reaktiivipartiid, jääk ja kokku). Tulemused on toodud DNA väikeste variantide puhul [Tabel 70](#) ja RNA fusioonide puhul [Tabel 71](#).

VAF-i variatsioon suurenes binoomjaotuse puhul oodatult koos keskmise väärtusega. Toetavate lugemite variatsioon suurenes arvandmete puhul oodatult koos keskmise väärtusega. Jääkkomponent oli koguvarieeruvuse suurim mõjutaja nii DNA väikeste variantide kui ka RNA fusioonide puhul mõlemal tasemel, toetades järeldust, et nende variantide avastamine TSO Comprehensive (EU) analüüsiga on kasutajate, partiide, seadmete ja päevade lõikes kindel.

Tabel 70 Sihitud DNA variantide kvantitatiivsed SD ja CV tulemused

VAF-i tase	Variant	Variandi tüüp	Kehtivate katsete arv	Keskmine VAF	Kasutaja SD (%CV)	Seadme SD (%CV)	Partii SD (%CV)	Päeva SD (%CV)	Jäägi SD (%CV)	Kogu SD (%CV)
~1 x LoD	RET D898_E901del	DELETIOON	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	DELETIOON	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)
~3 x LoD	RET D898_E901del	DELETIOON	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	DELETIOON	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)

Tabel 71 Sihitud RNA fusioonide kvantitatiivsed SD ja CV tulemused

Toetavate lugemite tase	Fusioon	Kehtivate katsete arv	Toetavate lugemite keskmine	Kasutaja SD (%CV)	Seadme SD (%CV)	Partii SD (%CV)	Päeva SD (%CV)	Jäägi SD (%CV)	Kogu SD (%CV)
~1 x 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 (rakuliin)	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 (proov 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (proov 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Toetavate lugemite tase	Fusioon	Kehtivate katsete arv	Toetavate lugemite keskmine	Kasutaja SD (%CV)	Seadme SD (%CV)	Partii SD (%CV)	Päeva SD (%CV)	Jäägi SD (%CV)	Kogu SD (%CV)
2–3 × 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 (rakuliin)	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 (proov 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (proov 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

2. uuring

Laborisisest kordustäpsust hinnati TMB ja MSI puhul. Skoorivahemiku lõikes eri tasemetel kordustäpsuse hindamiseks kasutati viit NSCLC FFPE DNA-proovi TMB jaoks ja seitset CRC FFPE proovi MSI jaoks, sh nii stabiilse MS-i kui ka kõrge MSI-ga. Kolm (3) kasutajat käitasid kõiki proove kolme (3) päeva jooksul kaks korda, kasutades kolme (3) teegivalmistust kolme (3) reaktiivipartii puhul ning kolme seadet NextSeq 550Dx, tehes iga taseme kohta 54 vaatlust.

MSI oleku puhul hinnati kvalitatiivset kooskõllalisust. TSO Comprehensive (EU) analüüs näitas MSI oleku puhul 100% kooskõla positiivsete vastete protsendi ja negatiivsete vastete protsendi korral. TMB puhul esitab TSO Comprehensive (EU) analüüs TMB skoori; kvalitatiivne kooskõllalisus ei kohaldu.

TMB ja MSI skooride koguvarieeruvus koos allika (seadmed, kasutajad, partiid, päevad ja jääk) mõjuga kvantifitseeriti, kasutades komponentide varieeruvuse mudelit kogu skoorivahemiku ulatuses. Standardhälve (SD) ja variatsioonikordaja (CV) on esitatud TMB puhul [Tabel 72](#) ja MSI puhul [Tabel 73](#) tasemete järgi. Mõnel tasemel oli kehtetute teekide tõttu vähem kui 54 vaatlust.

Tabel 72 TMB skoori SD ja CV kvantitatiivsed tulemused

Tase	TMB keskmine skoor	Kehtivate katsete arv	Kasutaja SD (%CV)	Seadme SD (%CV)	Partii SD (%CV)	Päev SD (%CV)	Jääk SD (%CV)	SD kokku (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30%)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Tabel 73 MSI skoori SD ja CV kvantitatiivsed tulemused

MSI olek	Tase	MSI keskmine skoor (%)	Kehtivate katsete arv	Operaatori SD (%CV)	Seadme SD (%CV)	Partii SD (%CV)	Päeva SD (%CV)	Jäägi SD (%CV)	SD kokku (%CV)
MS-stabiilne	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-High	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

TMB skooride varieeruvus kaldub arvandmete teoreetilise jaotuse põhjal oodatult koos keskmise väärtusega. MSI skooride varieeruvus tasemete puhul, mis jäävad MSI skoori 50 lähedale, on suuremad kui MSI skooride varieeruvus 0 või 100 lähedal, mis on kooskõlas varieeruvusega proportsioonandmete teoreetilise jaotuse põhjal. Jääkkomponent jäi nii MSI kui ka TMB skooride koguvarieeruvuse suurimaks mõjutajaks, toetades järeldust, et skoorid on kasutajate, partiide, seadmete ja päevade lõikes kindlad. Aga nii MSI kui ka TMB on keerukad biomarkerid ja analüütiline toimivus võib proovide vahel erineda. See tähendab, et TMB varieeruvus sõltub lisaks TMB väärtusele ka variantide koosseisust proovis, nt variandi tüüp (SNV, indel) ja VAF-i tase (kaugus kaasamise piirväärtusest). Samamoodi sõltub MSI varieeruvus lisaks MSI väärtusele ka kohtade koosseisust proovis, nagu ebastabiilsete kohtade arv ja ebastabiilsuse hulk koha kohta.

C5 ja C95 väärtused 20,00% piirväärtuse ümber määrati MSI puhul kindlaks kordustäpsuse profiiliga (Tabel 74).

Tabel 74 MSI C5–C95 intervall

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

Hinnati kasvajasalduse mõju TMB ja MSI skooridele. Enamiku proovide puhul oli kasvajasalduse $\geq 30\%$ mõju TMB skooridele üle ligikaudu 10 mutatsiooni megabaasi kohta ebaoluline. TMB skoorid jäid kasvajasalduse suurenedes suhteliselt muutumatuks. Kõrge MSI-ga (MSI-High) proovide puhul näitas kasvajasaldus positiivset lineaarset korrelatsiooni MSI skooriga. Kõrge MSI-ga proovid jäid keskmiselt tasemele MSI-High, kui kasvajasaldus oli $\geq 30\%$. Endomeetriumpiirväärtused kasutasid selgelt teistmoodi kui teised koetüübid ja nende puhul oli tasemega MSI-High avastamiseks vajalik suurem kasvajasaldus.

Kasvaja profiili koostamise täpsus

Variantide tuvastamist analüüsiga TSO Comprehensive (EU) võrreldi võrdlusmeetodi tulemustega. DNA väikesi variante ja TMB-d võrreldi väliselt valideeritud kogu eksoomi NGS meetodiga. Geeniamplifikatsioone võrreldi sama kogu eksoomi NGS meetodiga või valideeritud in situ topelthübridisatsiooni meetodiga (DISH) HER2 amplifikatsioonide korral. MSI-d hinnati võrdluses valideeritud MSI-PCR analüüsiga. RNA splaissvariante võrreldi valideeritud kvantitatiivse PCR-i (qPCR) meetodiga. ROS1 ja ALK fusioone võrreldi valideeritud FISH-analüüsiga. Kõiki muid fusioone võrreldi liitmeetodiga, mis hõlmas valideeritud RNA kogu eksoomi NGS-analüüsi (RNGS1), sihitud NGS-paneeli (RNGS2) ja tilga digitaalset PCR-i (ddPCR).

DNA väikese variandi avastamine

DNA väikeste variantide avastamise tulemusi analüüsiga TSO Comprehensive (EU) võrreldi kogu eksoomi sekveneerimisega (WES), mis kasutab iduliini ja somaatiliste väikeste variantide määramiseks WES-i koos ühitatud kasvajakoe ja terve koe proovide paaridega. Väikeste variantide (ühe nukleotiidiga variandid (SNV), insertioonid ja deletsioonid) vaheline võrdlus põhines 124 proovil 14 eri koetüübist, mis olid kehtivad nii TSO Comprehensive (EU) analüüsi kui ka WES puhul. TSO Comprehensive (EU), kuid mitte WES-analüüs suudab avastada mitme nukleotiidi variante (MNV, 2–3 aluspaari), mis nõuab faasimist. TSO Comprehensive (EU) MNV-sid hinnati WES-iga võrdlemisel üksikute SNV-dena. Kooskõllalisuse kokkuvõtte varianditasemel, sh positiivsete protsentuaalne kokkulangevus (PPA) ja negatiivsete protsentuaalne kokkulangevus (NPA) kõigi avastatud variantide puhul on näidatud [Tabel 75](#).

Tabel 75 Iduliini või somaatilise seisundi alusel hinnatud väikeste variantide avastamise kooskõllalisusanalüüsi kokkuvõtte

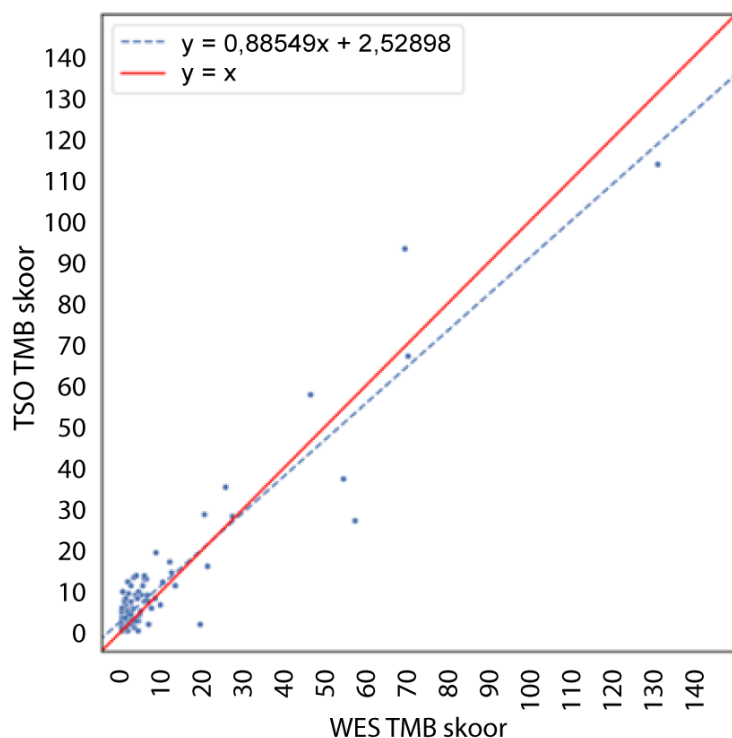
	WES-i avastatud somaatilised	WES Germline Called	WES ei avastanud
TSO Comprehensive (EU) Avastatud	382	33,163	426
TSO Comprehensive (EU) Mitteavastatud	69	61	70,000,481
Kokku	451	33,224	70,000,907
Protsentuaalne kokkulangevus	PPA: 85% (382/451), 95% CI: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33,163/33,224) 95% CI: [99,8%; 99,9%]	NPA: > 99% (70 000 481/70 000 907) 95% CI: [99,999; 99,999%]

Kokku avastas TSO Comprehensive (EU) 426 varianti, mida WES-meetodiga ei avastatud. Neist variantidest 204-l (48%) oli variandi alleelisagedus (variant allele frequencies, VAF) allpool WES-meetodiga avastamise piirväärtust. Ülejäänud potentsiaalselt positiivsetest variantidest oli variandi avastamise tõendus WES-meetodiga väike. Samuti oli paljudel variantidel ühitatud terve koe proovides väga madal tõendus WES-meetodi puhul. See tulemus viitab sellele, et WES ei leidnud neid variante kasvajast selle normaalse kontaminatsiooni tõttu.

Kasvaja mutatsioonikoormuse avastamine

TMB kooskõlalisuse määramiseks võrreldi TMB skoori (somaatilised mutatsioonid/megabaas) WES-meetodi ja TSO Comprehensive (EU) analüüsi vahel 124 prooviga, millel olid saadaolevad andmed nii analüüsi TSO Comprehensive (EU) kui ka WES-meetodi puhul. Lineaarse regressiooni analüüsis WES-meetodi kui prognoosijaga oli y-lõikepunkt 2,53, kalle 0,89 ja Pearsoni korrelatsioonikoefitsient 0,94 ([Joonis 3](#)).

Joonis 3 TMB skoori korrelatsioon WES-meetodi ja TSO Comprehensive (EU) analüüsi vahel



Geeniampifikatsiooni avastamine

Geeniampifikatsiooni avastamist analüüsiga TSO Comprehensive (EU) võrreldi sama WES-analüüsi tulemustega, kasutades kas kasvaja ja terve koe ühitatud proove või ainult kasvaja koeproove. Kokku kasutati 420 proovist 183-l ortogonaalset kasvaja-/normaalmeetodit ja 237-l kasutati ainult kasvajameetodit. 420 proovist valiti uuringu jaoks 50 proovi, sest need olid amplifikatsioonpositiivsed analüüsiga TSO Comprehensive (EU) või sellele eelneva analüüsiga. Nende karakteriseeritud proovide toimivust kohandati keskmise fusiooni levimusega. Kombineeritud toimivus karakteriseeritud ja karakteriseerimata proovides kasutas pöördvariatsiooniga kaalutud keskmist. Proovid pärinesid 14 koetüübist ja sisaldasid 55 geeni amplifikatsioone. TSO Comprehensive (EU) teatab MET ja ERBB2 geenide geeniampifikatsioonidest. Täpsust hinnati kõigi 55 geeni puhul. Geeniampifikatsioonide vastete kokkuvõte on toodud [Tabel 76](#).

Tabel 76 Geeniamplifikatsioonide vastavuse kokkuvõte

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

* Usaldusvahemik arvutatud bootstrapi meetodil.

ERBB2 (HER2) amplifikatsioone mao- ja rinnakoes analüüsiti teistest geeniamplifikatsioonidest eraldi, kasutades in situ topelthübridisatsiooni meetodit (Dual In-Situ Hybridization Method, DISH). Kokku analüüsiti IHC või FISH-iga 116 rinna- ja maoproovi, millest eelnevalt oli 64 kirjeldatud HER2-positiivsena. Üks proov nurjus eraldamisel, neli proovi ei olnud kehtivad analüüsiga TSO Comprehensive (EU) ja kolm proovi ei olnud kehtivad analüüsiga DISH. 108 proovist oli 20-l (18,5%) piiripealne skoor (vahemikus 1,5–2,5) analüüsi DISH piirväärtuse 2,0 lähedal. Kooskõlalise tulemused, sh PPA, NPA kõigi proovide puhul, samuti piiripealsete HER2 DISH-i juhtude väljajätt, on näidatud [Tabel 77](#).

Tabel 77 Kooskõlalise kokkuvõtte analüüside TSO Comprehensive ja HER2 DISH vahel, k.a HER2 geeniamplifikatsiooni puhul

HER2 geeniamplifikatsioon Kõik (rinna- ja maokude)	HER2 DISH, amplifitseeritud	HER2 DISH, amplifitseerimata
TSO Comprehensive (EU) Positiivne	17 (sh 1 piiripealne)	13 (sh 1 piiripealne)
TSO Comprehensive (EU) Negatiivne	10 (sh 6 piiripealset)	68 (sh 12 piiripealset)
Protsentuaalne kokkulangevus, sh piiripealsed juhud	PPA: 63% (17/27) 95% CI: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95% CI: [74%, 90%]
Protsentuaalne kokkulangevus, v.a piiripealsed juhud	PPA: 80% (16/20) 95% CI: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95% CI: [72%, 90%]

Mikrosatelliitide ebastabiilsuse avastamine

Mikrosatelliitide ebastabiilsuse avastamist analüüsiga TSO Comprehensive (EU) võrreldi kehtivate MSI-PCR-analüüsi tulemustega, mis kasutab analüüsimiseks kasvaja ja terve koe ühitatud proovide võrdlust. Kokku võrreldi 195 proovi, mis vastasid kasvajasisalduse nõudele $\geq 30\%$ (MS-stabiilse staatuse jaoks) ja esindasid 14 koetüüpi. MSI-PCR hindab 5 kohta ja sellel on 3 tulemust – MSI-stabiilne (ebastabiilne koht puudub), MSI-Low (MSI-madal, üks ebastabiilne koht) ja MSI-High (MSI-kõrge, kaks või enam ebastabiilset kohta). TSO Comprehensive (EU) hindab kuni 130 mikrosatelliitide kohta ja klassifitseerib proovid ainult kui MSS või MSI-High ($\geq 20\%$ ebastabiilseid kohti). MSI-Low lisati ühte rühma MSI-PCR-i MS-stabiilsete tulemustega. Kooskõlalise analüüs on näidatud [Tabel 78](#).

Tabel 78 TSO Comprehensive (EU) ja MSI-PCR vahelise DNA mikrosatelliitide ebastabiilsuse kooskõlalisusanalüüsi kokkuvõte

MSI olek	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSI-Stable
TSO Comprehensive (EU) Ebastabiilne (MSI-kõrge)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabiilne (MS-stabiilne)	3	0	150
Kokku	44	2	150
Protsentuaalne kokkulangevus	PPA: 93% (41/44) 95% CI: [82%, 98%]	NPA: 99% (150/152) 95% CI: [95%, > 99%]	

RNA splaissvariandi avastamine

Splaisvariandi avastamise täpsuse arvutamiseks võrreldi TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemusi qPCR-analüüsidesega variantide EGFRvIII ja MET eksoni 14 vahelejätt kohta, sh üht teadaolevat positiivset RNA-d iga splaisvariandi kohta. Kooskõlalisusanalüüs viidi läbi kokku 230 kordumatu FFPE RNA-prooviga 14 koetüübist, mille kohta olid andmed saadaval nii analüüsist TSO Comprehensive (EU) kui ka võrdlusmeetodist. Kõiki proove testiti MET eksoni 14 vahelejätmise suhtes, samas kui EGFRvIII-t testiti ainult ajukoos. Kolm proovi, mida nimetati MET eksoni 14 vahelejätmise suhtes positiivseks qPCR-i järgi, kuid mitte TSO Comprehensive (EU) järgi, olid keskmise Ct-ga > 37 ja alla TSO Comprehensive (EU) LoD taseme. Tabel 79 on kokku võetud vastavusuuringu tulemused.

Tabel 79 Analüüsides TSO Comprehensive (EU) ja qPCR vahelise RNA splaissvariantide kooskõlalisusanalüüsi kokkuvõte

RNA splaisvariandid	qPCR, positiivne	qPCR, negatiivne
TSO Comprehensive (EU) Positiivne (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negatiivne (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) Positiivne (MET eksoni 14 vahelejätt)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Negatiivne (MET eksoni 14 vahelejätt)	3	217
Kokku	7	230
Protsentuaalne kokkulangevus	PPA: 57% (4/7) 95% CI: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95% CI: [98%, 100%]

RNA fusiooni avastamine

Võrdlus liitmeetodiga

TSO Comprehensive (EU) fusioone võrreldi liitmeetodiga, mis sisaldab RNA kogu eksoomi sekveneerimist NGS-paneeli (RNGS1), sihitud NGS-fusioonipaneeli (RNGS2) ja tilga digitaalse PCR-i (ddPCR) abil.

RNGS1-meetod kattub kõigi geenidega, mille puhul TSO Comprehensive (EU) suudab fusioone avastada. RNGS1-meetodi avastamispiir oli kattuvates fusioonileidudes täheldatud toetavate lugemite arvu põhjal siiski 4–8 korda väiksem kui TSO Comprehensive (EU) puhul. Seetõttu kasutati koos kogu WES (RNGS1) meetodiga kahe täiendava meetodi liitmeetodit, mille tundlikkus on suurem, kuid fusioonide ulatus väiksem.

RNGS1 abil analüüsiti kokku 255 kordumatut RNA-proovi, mis esindasid 14 koetüüpi ja läbisid TSO Comprehensive (EU) mõõdikud. Kaks proovi olid RNGS1 proovi kvaliteedikontrolli puhul kehtetud ja välistati täiendavast analüüsimisest. TSO Comprehensive (EU) avastatud 82 fusioonist välistati hindamisest neli fusiooni RNGS1 proovi kvaliteedikontrolli nurjumise tõttu ja seitse täiendavat fusiooni polnud avastatavad sihtmärkide puudumise tõttu RNGS1 paneelil. Ülejäänud 71-st TSO Comprehensive (EU) abil avastatud fusioonist kinnitati 9 fusiooni RNGS1-ga. RNGS1 avastas 4 fusiooni, mida ei avastanud TSO Comprehensive (EU).

62 fusioonist, mis olid TSO Comprehensive (EU) põhjal positiivsed, kuid mida RNGS1 ei avastanud, kattusid ja kinnitati 13 RNGS2-ga. RNGS2 avastas ühe fusiooni, mida ei avastanud TSO Comprehensive (EU).

Seejärel kasutati TSO Comprehensive (EU) abil avastatud fusioonide puhul, mida RNGS1-ga ei avastatud või pole avastatavad ning mida RNGS2-ga ei saa hinnata, tilga digitaalset PCR-i (49). Lisaks kasutati ddPCR-i, et hinnata uuesti kaht neljast valenegatiivsest fusioonist TSO Comprehensive (EU) puhul koos RNGS1-ga ja kaht üheksast kooskõllalisest fusioonist TSO Comprehensive (EU) ja RNGS1 puhul. Spetsiifilisuse kontrollimiseks lisati iga fusioonpositiivse proovi analüüsimisse viis fusioonnegatiivset proovi. 18 fusiooni ei analüüsitud ddPCR-iga võimetuse tõttu kujundada praimereid/sonde, fusiooni mitme geenipartneri tõttu või järelejäänud ebapiisava FFPE materjali tõttu. ddPCR-i puhul kujundati praimerid ja sondid TSO Comprehensive (EU) täheldatud murdepunktide kohaselt.

ddPCR-iga avastati kokku 52 fusiooni, millest 41 avastas TSO Comprehensive (EU), kuid ei avastanud või pole avastatavad RNGS1-ga. ddPCR avastas üheksa fusiooni, mida TSO Comprehensive (EU) ega RNGS1 ei avastanud. Kaks ddPCR-iga positiivset fusiooni kinnitasid kaht kooskõllalist fusiooni TSO Comprehensive (EU) ja RNGS1 puhul. ddPCR ei avastanud ühtki fusiooni TSO Comprehensive (EU) kahe kordushinnatud valenegatiivse fusiooni puhul koos RNGS1-ga, need loeti RNGS1 võrdluse põhjal siiski valenegatiivseks.

255 proovist valiti uuringusse 35 proovi, kuna need olid TSO Comprehensive (EU) analüüsi või eelneva analüüsi suhtes fusioonpositiivsed. Nende karakteriseeritud proovide toimivust kohandati keskmise fusiooni levimusega. Kombineeritud toimivus karakteriseeritud ja karakteriseerimata proovides kasutas pöördvariatsiooniga kaalutud keskmist. Fusioonide kooskõllalised tulemused on näidatud [Tabel 80](#).

Liitmeetodiga kooskõllalised 66 fusiooni (54 unikaalset fusiooni) esindavad TSO Comprehensive (EU) analüüsi paneelil 43 geeni. Siiski esitatakse fusioonid ainult [Tabel 80](#) nimetatud 23 geeni hulgast.

Tabel 80 RNA fusioonide kooskõlalise kokkuvõte

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

* Usalduse intervall arvutatakse bootstrapiga.

FISH-meetodi võrdlus fusioonide ROS1 ja ALK puhul

FISH-meetodiga analüüsiti nii fusioonide ROS1 kui ka ALK puhul 25 NSCLC proovi ja fusioonidega ROS1 analüüsiti vastavalt 5 täiendavat NSCLC proovi. Ebapiisava koe tõttu nurjus FISH-meetodiga ROS1 puhul kaheksa proovi. Nii TSO Comprehensive (EU) kui ka FISH avastasid kaks fusiooni ROS1 ja ühe fusiooni ALK. Mittekooskõlalisi tulemusi ei täheldatud. [Tabel 81](#) on kokku võetud ROS1 ja ALK fusioonide TSO Comprehensive (EU) ja FISH-meetodi kooskõlalise tulemused.

Tabel 81 ROS1 ja ALK fusioonide puhul kasutatava TSO Comprehensive (EU) ja FISH meetodi kooskõlalise tulemuste kokkuvõte

ALK + ROS1	FISH, positiivne	FISH, negatiivne
TSO Comprehensive (EU) Positiivne	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negatiivne	0	44
Kokku	3	44
Protsentuaalne kokkulangevus	PPA: 100% (3/3) 95% CI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95% CI: [92%, 100%]

Proovi kehtivus

Proovi kehtivust (esimene katse) mõõdeti 181 kordumatu RNA-proovi ja 272 kordumatu DNA-proovi puhul FFPE plokkidest vanusega ≤ 5 aastat. Need proovid valiti koetüübi ja saadaoleva materjali põhjal, analüüsi kehtivus polnud teada. Kehtivana lugemiseks peavad teegi kvaliteedikontrolli mõõdikud vastama variandi tüübi tingimustele. Proovi kehtivust hinnati iga varianditüübi (DNA väikesed variandid/TMB, MSI, geeniamplifikatsioonid, fusioonid/splaiisvariandid) puhul eraldi ja see on näidatud [Tabel 82](#). Prognoositakse, et reaktiivide saatmise tõttu väheneb MSI kehtivus FFPE plokkide puhul ≤ 2 aasta vanuselt 1%.

Tabel 82 Proovi kehtivus

Variandi tüüp	Proovi kehtivus
Fusioonid/splaiisvariandid (RNA)	76%
DNA väikesed variandid/TMB	75%
MSI	72%
Geeniamplifikatsioon	94%

Kasvaja profileerimise nõuete analüütilise valideerimise kokkuvõte

Avastamispiiri, kordustäpsuse, korratavuse ja täpsuse andmete põhjal on TSO Comprehensive (EU) analüütiliselt kehtiv järgmiste puhul:

- DNA väikesed variandid: SNV-d, MNV-d, insertioonid ja deletsioonid.
- TMB
- MSI
- Geeniamplifikatsioonid MET ja ERBB2 (HER2) (vt [Tabel 2](#)).
- 23 geeni, mille puhul saab fusioone avastada (vt [Tabel 2](#)).
- Splaissvariandid EGFR ja MET (vt [Tabel 2](#)).

NTRK kliiniline toimivus

Selleks, et valideerida TSO Comprehensive (EU) analüüsi kehtivust kaasdiagnostilise (CDx) meetodina ravimiga VITRAKVI® (larotrektiniib) ravitavate patsientide valimisel, analüüsiti larotrektiniibi kliinilistesse uuringutesse (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; ühiselt larotrektiniibi uuringuproovid) värvatud patsientidelt võetud proove, kasutades andmete esitamise lõpptähtaega 15. juuli 2019, mida täiendati kaubanduslikult tarnitud FFPE-koeproovidega, et saada toetavaid andmeid TSO Comprehensive (EU) analüüsi täpsusuuringu ja kliinilise lisauuringu tegemiseks.

NCT02122913 oli mitmekeskuseline avatud I faasi suurendatava annusega uuring täiskasvanud patsientidele, kellel on kaugelearenenud soliidtuumor (avatud kõigile), NTRK fusioonpositiivse vähi suhtes selekteerimata. Pärast uuringu annuse suurendamise faasi alustati annuse laiendamist dokumenteeritud NTRK fusioonpositiivse vähiga patsientidel ja patsientidel, kellel võiks uurija arvates olla kasu tugevalt selektiivsest TRK inhibiitorist. NAVIGATE NCT02576431 on käimasolev mitmekeskuseline avatud II faasi korv-uuring 12-aastastele ja vanematele patsientidele, kellel on retsiveerunud kaugelearenenud soliidtuumor ja välise labori hinnangul dokumenteeritud NTRK fusioon. SCOUT NCT02637687 on käimasolev mitmekeskuseline avatud I/II faasi uuring lapspatsientidele alates sünnist kuni 21. eluaastani, kellel on kaugelearenenud soliidtuumor või primaarne kesknärvisüsteemi (KNS) kasvaja.

TSO Comprehensive (EU) analüüsi uuringusse kaasatud NTRK fusioonpositiivsetest patsientidest moodustasid 164 patsienti larotrektiniibi laiendatud primaarse efektiivsuse rühma (ePAS4).

NTRK1, NTRK2, NTRK3 fusioonide tuvastamise täpsusuuring

TSO Comprehensive (EU) analüüsi täpsust NTRK fusioonide (NTRK1, NTRK2 või NTRK3) tuvastamisel soliidtuumoriga patsientidel tõestati nii, et hinnati NTRK fusiooni tulemuste kooskõllalisust analüüsi TSO Comprehensive (EU) ja järgmise põlvkonna sekveneerimisel (NGS) põhineva kehtiva ortogonaalse meetodi vahel.

Tehti retrospektiivne mittesekkuv uuring. Larotrektiniibi uuringuproove ja lisaproove analüüsiti TSO Comprehensive (EU) analüüsiga ühes välises keskuses ning ortogonaalse meetodiga kesklaboris. TSO Comprehensive (EU) analüüsi NTRK fusioonide avastamise täpsust hinnati ortogonaalse meetodi suhtes; arvutati positiivsete protsentuaalne kokkulangevus (PPA), negatiivsete protsentuaalne kokkulangevus (NPA) ja seotud kahepoolsed 95% usaldusvahemikud (CI-d).

Analüüsiga TSO Comprehensive (EU) ja/või ortogonaalse meetodiga analüüsiti 516 proovi. Neist 499 proovi analüüsiti mõlema meetodiga. Seitsetteist proovi 516 proovist ei analüüsitud ühega analüüsides kas eraldamise nurjumise, tundmatu põhjuse (ortogonaalse meetodi korral) või protokollist hälbumise tõttu. 499 proovist, mida analüüsiti mõlema meetodiga, olid 170 (34,1%) larotrektiniibi uuringuproovid ja 329 (65,9%) lisaproovid.

499 proovi tulemuste risttabel on näidatud Tabel 83. 499 proovist olid 85-l kehtetud TSO Comprehensive (EU) analüüsitulemused; neist 85-st 53-l olid ka kehtetud ortogonaalse meetodi tulemused. Veel seitsmel proovil olid üksnes ortogonaalse meetodi tulemused kehtetud. Seega olid mõlema meetodiga kehtivad tulemused 407 proovil 499-st.

Tabel 83 NTRK täpsuse uuring: TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemusi NTRK fusioonide tuvastamisel ortogonaalse meetodi tulemustega võrdlev risttabel

TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemus	Ortogonaalse meetodi tulemus			
	NTRK fusioon positiivne	NTRK fusioon negatiivne	Kehtetu	Kokku
NTRK fusioon positiivne	114	16	1	131
NTRK fusioon negatiivne	4	273	6	283
Kehtetud*	4	28	53	85
Kokku	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) analüüsi kehtetud tulemused pärinevad nii proovi kui ka käituse tasemelt.

Kokkuleppe analüüsid, välja arvatud ja kaasa arvatud kehtetud TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemused, on näidatud Tabel 84. Ilma kehtetute TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemusteta oli PPA 96,6% (114/118; 95% CI: 91,5%–99,1%) ja NPA 94,5% (273/289; 95% CI: 91,2%–96,8%).

Tabel 84 NTRK täpsuse uuring: TSO Comprehensive (EU) analüüsi PPA ja NPA tulemused NTRK fusioonide tuvastamisel võrreldes ortogonaalse meetodi tulemustega

Kokkulangevuse mõõt	Välja arvatud kehtetud TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemused		Kaasa arvatud kehtetud TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemused	
	Kokkulangevus, % (n/N)	95% CI*	Kokkulangevus, % (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 (täpse) Clopperi-Pearsoni meetodi alusel.

NTRK1, NTRK2, NTRK3 fusioonide tuvastamise kliiniline sildamisuuring

TSO Comprehensive (EU) analüüsi kliinilist kehtivust NTRK1, NTRK2 või NTRK3 fusioonide tuvastamisel soliidtuumoriga patsientidel, kellel võiks olla kasu ravist larotrektiniibiga, tõestati kliinilises sildamisuuringus. Uuring tehti, et hinnata TSO Comprehensive (EU) analüüsi kliinilist efektiivsust NTRK1, NTRK2 või NTRK3 fusiooni suhtes positiivsete ehk larotrektiniibist potentsiaalselt kasu saavate patsientide tuvastamisel ning et hinnata TSO Comprehensive (EU) analüüsi ja kohalike analüüsimeetodite (LT) kooskõllalisust (kasutatakse NTRK fusiooni oleku määramiseks larotrektiniibi kliinilistes uuringutes).

LT-meetodid olid NGS, in situ fluorestsentsühbriidimine (FISH), polümeraasi ahelreaktsioon (PCR) ja NanoString-analüüsid. NTRK fusioone (ETV6 NTRK3) eeldati infantiilse fibrosarkoomiga patsientidel, kellel oli dokumenteeritud FISH-meetodil tuvastatud ETV6 translokatsioon. Enamikku 235 patsiendist, kes osalesid larotrektiniibi uuringus ja kellel oli NTRK fusiooni olek teada, analüüsiti NGS-meetoditel.

Andmete esitamise lõpptähtajaks 15. juuliks 2019 oli värvatud 279 patsienti. 279 patsiendist olid 208 NTRK fusiooni suhtes positiivsed. 208 positiivsest patsiendist moodustasid 164 larotrektiniibi rühma ePAS4.

Larotrektiniibi efektiivsusanalüüsi esmane tulemusnäitaja oli üldine ravivastuse määr (ORR) sõltumatu läbivaatuskomitee (IRC) hinnangul, kasutades kolme kliinilise uuringu liidetud andmestikku. ORR-i hinnati prima üldise ravivastuse määraga patsientide osakaalu alusel – kas kinnitatud täielik ravivastus või kinnitatud osaline ravivastus RECIST-kriteeriumite versiooni 1.1 alusel. ORR larotrektiniibi rühmas ePAS4 oli 72,6% (95% CI [65,1%; 79,2%]) ja hõlmas 16 eri kasvajatüübiga patsiente.

Proovide arvestus

Proovikogum hõlmas tüüpilisi proove paljudest eri kasvajatüüpidest nii lastelt kui ka täiskasvanutelt.

Larotrektiniibi uuringutesse oli 15. juuliks 2019 värvatud 279 patsienti. Neist 235-l oli NTRK fusiooni olek LT-meetodi alusel teada: 208 olid positiivsed ja 27 negatiivsed. 44 patsiendil ei olnud NTRK fusiooni olek teada, kuna uuringute NCT02122913 ja SCOUT NCT02637687 annuse suurendamise faasides ei olnud analüüsimine patsiendi uuringusse kaasamiseks vajalik. TSO Comprehensive (EU) analüüsi kliinilisse sildamisuuringusse kaasamise kriteeriumid täitsid proovid larotrektiniibi uuringute patsientidelt, kes olid värvatud 15. juuli 2019 seisuga ja kelle NTRK fusiooni olek oli teada (208 positiivset patsienti ning 27 negatiivset patsienti), ja lisaproovid, mille NTRK fusiooni olek leiti tüüpiliste LT-meetoditega olevat negatiivne.

208 positiivsest larotrektiniibi uuringute proovist olid 154 saadaval ka analüüsiga TSO Comprehensive (EU) analüüsimiseks. Neist 138 korral saadi kehtivad tulemused. Viisteist proovi olid kehtetud, kuna need ei läbinud proovi sekveneerimise kvaliteedikontrolli mõõdikuid, ja 1 proovi ei analüüsitud protokollist häälbimise tõttu. 27 negatiivsest larotrektiniibi uuringute proovist olid 24 analüüsimiseks saadaval. Neist 22 korral saadi kehtivad TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemused. Kaks proovi olid kehtetud, kuna need ei läbinud proovi sekveneerimise kvaliteedikontrolli mõõdikuid.

Lisaproove sõeluti ühel kahest tüüpilisest LT-meetodist. Saadi üle 350 proovi, mida uuriti kasvajasisalduse suhtes. Proovinõuetele vastavatest lisaproovidest eraldati 266 edukalt ja nende NTRK fusiooni olek leiti tüüpiliste LT-meetoditega olevat negatiivne. Neist 260 proovi olid saadaval analüüsiga TSO Comprehensive (EU) analüüsimiseks, millest 222 korral saadi kehtivad tulemused. 38 proovi olid kehtetud, kuna need ei läbinud

proovi sekveneerimise kvaliteedikontrolli mõõdikuid (n = 25) või kuna nende käituse sekveneerimine nurjus (n = 13). NTRK fusioonnegatiivsete proovide koguhulk koosnes 222 lisaproovist ja 22 larotrektiniibi uuringute proovist.

Kooskõlalisuse tulemused

Kokku testis TSO Comprehensive (EU) 437 proovi. 208 NTRK fusiooni suhtes positiivse patsiendi seas oli 153 proovi, mis olid saadaval ja mida testis TSO Comprehensive (EU), saades 138 kehtivat ja 15 kehtetut tulemust. TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemuste kokkulangevust LT-meetoditel saadud tulemustega nii koos TSO Comprehensive (EU) analüüsi kehtetute tulemustega kui ka ilma nendeta on näidatud [Tabel 85](#).

Tabel 85 NTRK kliiniline lisauuring: TSO Comprehensive (EU) analüüsi ja LT meetodite kooskõla NTRK fusioonide tuvastamisel

	Välja arvatud TSO Comprehensive (EU) analüüsi kehtetud tulemused		Kaasa arvatud TSO Comprehensive (EU) analüüsi kehtetud tulemused	
Kokkulangevuse mõõt	Kokkulangevuse % (n/N)	95% CI*	Kokkulangevuse % (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

* Kahepoolsed 95% CI-d arvutati (täpse) Clooper-Pearsoni meetodiga.

Tundlikkusanalüüs TSO Comprehensive (EU) analüüsi puuduvate tulemuste suhtes tõestas kokkulangevuse analüüsi kindlust. TSO Comprehensive (EU) analüüsi puuduvad tulemused LT NTRK fusioonpositiivsete patsientide kohta (n = 70) imputeeriti logistilise regressiooni mudeliga. Kokkulangevuse hinnangud, sealhulgas imputeeritud väärtused, on esitatud [Tabel 86](#).

Tabel 86 NTRK kliiniline lisauuring: NTRK kliiniline sildamisuuring: TSO Comprehensive (EU) analüüsi ja LT-meetodite kooskõlalisus NTRK fusioonide tuvastamisel, sealhulgas imputeeritud väärtused TSO Comprehensive (EU) analüüsi puuduvate tulemustega LT alusel positiivsete patsientide kohta

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

TSO Comprehensive (EU) analüüsi puuduvaid tulemusi LT alusel fusioonnegatiivsete patsientide kohta ei imputeeritud.

* Kahepoolsed 95% CI-d arvutati mitmekordse imputeerimise Booti meetodiga. Mitmekordse imputeerimise Booti meetod on mitmekordsesse imputeerimisse pesastatud eellaadimissamm (Schomaker ja Heumann, 2018).

TSO Comprehensive (EU) analüüsi ja LT-de vahelised kokkulangevused meetodi tüübi järgi (nt RNA NGS, FISH) on esitatud [Tabel 87](#).

Tabel 87 NTRK kliiniline lisauuring: TSO Comprehensive (EU) analüüsi ja LT-meetodite kooskõlalisus NTRK fusioonide tuvastamisel LT-meetodi tüübi järgi

LT-meetodi tüüp	Kokkulangevuse mõõt	Kokkulangevuse % (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	Ei arvatatud (1/1)	Ei arvatatud
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2; 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1; 100,0)
	NPA	Ei arvatatud (0/0)	Ei arvatatud
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1; 100,0)

Ei arvatatud: alamrühmade korral, mille proovide arv oli < 5, kokkulangevuse statistilisi andmeid ei arvatatud.

¹ Kahepoolsed 95% CI-d arvutati (täpse) Clopperi-Pearsoni meetodiga.

² Hõlmab NGS-i meetodeid, milles kasutatakse kas ainult RNA-d või nii DNA-d kui ka RNA-d.

437-st analüüsiga TSO Comprehensive (EU) analüüsitud proovist olid 24-l LT-dega mittekooskõlalised tulemused: 15 olid LT-de alusel positiivsed ja analüüsi TSO Comprehensive (EU) alusel negatiivsed ning 9 olid LT-de alusel negatiivsed ja TSO Comprehensive (EU) analüüsi alusel positiivsed. 24-st mittekooskõlaliste tulemustega proovist analüüsiti 8 proovi DNA NGS LT-meetodiga, 14 proovi RNA NGS LT-meetodiga ja 2 proovi FISH-meetodiga.

Valideeritud sõltumatu NGS-meetodiga kinnitati TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemused 14 proovis 24-st mittekooskõlaliste tulemustega proovist. Ülejäänud 10 proovi korral olid TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemused mittekooskõlalised nii LT-meetodiga kui ka sõltumatu NGS-meetodiga.

Kliinilise efektiivsuse tulemused

Kohordis ePAS4 oli larotrektiniibi efektiivsus analüüsiga TSO Comprehensive (EU) positiivsete ja LT-ga positiivsete patsientide populatsioonis (97 patsienti, ORR = 78,4%, 95% CI [68,8%; 86,1%]) sarnane larotrektiniibi efektiivsusega kogu ePAS4 populatsioonis (164 patsienti, ORR = 72,6%, 95% CI [65,1%; 79,2%]) (Tabel 88). 97-st analüüsiga TSO Comprehensive (EU) positiivsest patsiendist rühmas ePAS4 olid 28 (28,9%) patsienti saavutanud täieliku ravivastuse / täieliku kirurgilise ravivastuse ja 48 (49,5%) patsienti osalise ravivastuse.

13-st analüüsiga TSO Comprehensive (EU) negatiivsest, LT-ga positiivsest patsiendist saavutas 1 (7,7%) larotrektiniibraviga täieliku ravivastuse ja 2 (15,4%) osalise ravivastuse.

Tabel 88 NTRK kliiniline lisauuring: ORR LT-positiivsete patsientide puhul LT järgi ja TSO Comprehensive (EU) tulemused ePAS4-s

		LT-ga fusioon positiivne N=164	TSO Comprehensive (EU) Positiivne ja LT-ga positiivne N=97	TSO Comprehensive (EU) Negatiivne ja LT-ga positiivne N=13
Parim üldine ravivastus, n (%)	Täielik ravivastus	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Täielik kirurgiline ravivastus	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Osaline ravivastus	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabiilne haigus	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progresseeruv haigus	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Polnud hinnatav	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Üldine ravivastuse määr	Patsientide arv, n	164	97	13
	Patsientide arv, kellel on 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)

Lühendid: CR = Complete Response (täielik ravivastus), PR = Partial Response (osaline ravivastus), sCR = Surgical Complete Response (täielik kirurgiline ravivastus).

* Kahepoolne 95% usaldusvahemik arvutati (täpse) Clopperi-Pearsoni meetodiga.

54 patsiendil puudusid TSO Comprehensive (EU) analüüsi tulemused.

Selle uuringu andmed toetavad TSO Comprehensive (EU) analüüsi ohutust ja efektiivsust kasutamisel NTRK fusiooniga soliidtuumoritega patsientide tuvastamiseks, kellel võiks olla kasu ravist larotrektiniibiga.

Viited

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

Muudatuste ajalugu

Läbivaatamine	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 200007789, v08	Mai 2025	Eemaldati viide tarkvaraversioonidele ja osa numbritele. Protseduuri uuendatud piirangud: • Nekrootilise koe teave. • MSI kasvaja sisu teave. Uuendatud: • NTC joonealune märkus kehtib nii min kui ka max teekide kohta. • Seadmete ja materjalide loend sisaldab plaadi tsentrifuugi spetsifikatsioone ja pipeti sammusid. • SPB ülekoormuse arvutamine 1,05-lt 1,15-kordsele. • Terminoloogia MET eksoni 14 del kuni MET eksoni 14 vahelejätmiseks. Lisatud: • Märkus SMB kohta jäädvustussuhtides üks ja kaks. • Valmistage ette sekveneerimise sissejuhatuseks. • Täiendav ultraheliatori teave. Lisatud selgitused ja ajakohastatud tulemused toimivusnäitajate kohta: • Segavad ained. • Kasvaja profiili määramise ja proovi valiidsuse täpsus. • Tuvastusuuringu 1. ja 2. piir. • Laborisisese täpsuse 1. uuring. • Reprodutseeritavuse 2. uuring. • Teegi stabiilsuse ja teegi säilitamise teave. • Kriitiline väärtus. Uuendatud keel ja grammatika.

Läbivaatamine	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 200007789, v07	Jaauar 2024	- Lisatud teave protseduuri piirangute kohta: - Nekrootilise koe ja kasvajasalduse proovi nõuded MSI osas kõrgetele ja somaatilistele draiveri mutatsioonidele. - Hemoglobiini võimalikud häired. - RET-geeni ja fusiooni tuvastuspiirid väljaspool annoteeritud geenipiire. - Geenide kustutamistest ei teatata. - Uuendatud kasutamiseks tarkvara TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager versiooniga 2.3.7. - Lisatud teave nõutavatele, kuid mitte tarnitavatele seadmetele ja materjalidele, sh kaks ultraheliaparaadi täiendavat konfiguratsiooni. - Uuendatud proovi ja proovimaterjali teave: - Nekrootilise koe sisaldus. - Proteinaas K ja hemoglobiini mõju. - Slaidile paigaldatud FFPE ja puhastatud nukleiinhappe säilitamine. - Lisatud teave reaktiivi käitlemise, töövoo ja käituse kvaliteedikontrolli tõrgete tõrkeotsingu parandamiseks. - Lisatud toimivushäitajate kontekst ja selgus: - Ristsaastumine - Nukleiinhapete eraldamiskomplekti hindamine - Segavad ained - Nukleiinhape ja slaidile paigaldatud FFPE stabiilsus - NTRK kliiniline toimivus - Uuendatud keel ja grammatika
Dokument nr 200007789 v06	veebuar 2023	- Täiendavad avaldused jaotises „Piirangud“ - Konventsiooni, grammatika ja selgusega seotud keeleuuendused - Tabelite 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 korrigeerimine - Avaldus sademete olemasolu kohta FSM-reagendis - Uuendatud termotsükleri ja karpide andmed seadmete ja materjalide loendis
Dokument nr 200007789 v05	September 2022	Uuendatud 2. uuringu reprodutseeritavuse tabelid

Läbivaatamine	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument # 200007789 v04	juuni 2022	• Lisatud analüüsimooduli TSO Comprehensive v2.3.5 osa numbrid • Eemaldatud analüüsimooduli TSO Comprehensive v2.3.3 osa numbrid • Uuendatud terminoloogia jaotises „Tühja piir“
Dokument nr 200007789 v03	Aprill 2022	• Lisati NTRK fusioonidega seotud toimivusnäitajate teave • Lisati märgistus FOR EXPORT ONLY (AINULT EKSPORTIMISEKS) • Värskendati sihtotstarbe teatist, lisades NTRK1–3 CDx-i nõude • Laiendati toote komponentide teavet, lisades sellele tarkvarakomponentide osa numbrid
Dokument nr 200007789 v02	veebruar 2022	• Parandatud on tabeli viite viga • Lisatud on iduliini ja somaatiliste variantidega seotud piirangud • Geeniamplifikatsiooni tuvastamise sõnastust on selgemaks muudetud
Dokument nr 200007789 v01	Detsember 2021	• Uuendatud on protseduuri piiranguid • Seadmete ja materjalide loendites on täpsustatud magnetluse ja termotsükleri spetsifikatsioone
Dokument nr 200007789 v00	november 2021	Esialgne väljalase

Patendid ja kaubamärgid

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjalikult, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA MITTE ÜKSIKASJALIKULT JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA. NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

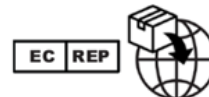
© 2025 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktteave



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Toote märgistus

Toote pakendil ja etikettidel olevate sümbolite täieliku kirjelduse leiате, kui külastate aadressi support.illumina.com ja avate oma komplekti vahekaardi *Documentation* (Dokumentatsioon).