TruSight Oncology Comprehensive (EU)

illumina®

Notice

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT. POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

Utilisation prévue

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) est un test de diagnostic *in vitro* qui utilise un séquençage ciblé de nouvelle génération pour détecter des variants dans 517 gènes à l'aide d'acides nucléiques extraits d'échantillons de tissu tumoral fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) provenant de patients cancéreux atteints de néoplasmes malins solides à l'aide de l'instrument Illumina® NextSeq™ 550Dx. Le test peut être utilisé pour détecter les variants nucléotidiques uniques, les variants multinucléotidiques, les insertions, les délétions et les amplifications génétiques à partir de l'ADN, et les fusions de gènes et les variants d'épissage à partir de l'ARN. Le test rapporte également un score de charge mutationnelle tumorale (TMB) et un statut d'instabilité des microsatellites (MSI).

Le test est destiné à servir de diagnostic compagnon pour identifier les patients atteints d'un cancer pour le traitement par la thérapie ciblée indiquée dans le Tableau 1, conformément à l'étiquetage du produit thérapeutique approuvé. En outre, le test est destiné à fournir des informations sur le profilage de la tumeur pour une utilisation par des professionnels de santé qualifiés conformément aux directives professionnelles et n'est pas concluant ou prescriptif pour l'utilisation étiquetée d'un produit thérapeutique spécifique.

Tableau 1 Indication de diagnostic compagnon

Type de tumeur	Biomarqueurs	Thérapie ciblée
Tumeurs solides	Fusions des gènes NTRK1, NTRK2 et NTRK3	VITRAKVI® (larotrectinib)

Résumé et explication du test

Description clinique

Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde et peut potentiellement trouver son origine dans n'importe quel tissu.[1, 2] L'analyse de la base génétique d'un cancer est importante pour identifier les patients pouvant bénéficier de thérapies ciblées et pour mettre au point de nouvelles méthodes de traitement. De nombreux gènes ont été impliqués dans la causalité ou la progression du cancer, et de nombreux cancers portent une variété de variants affectant ces gènes et leurs fonctions. Ces variants peuvent comporter des mutations génétiques telles que les variants mononucléotidiques (SNV), les variants multinucléotidiques (MNV), les insertions ou délétions, les amplifications génétiques, les fusions génétiques et les variants d'épissage. Une autre conséquence des mutations génétiques cancéreuses est la présentation de néo-antigènes qui

déclenchent des réponses immunitaires spécifiques au cancer. L'état mutationnel d'un cancer peut être représenté par la TMB et la MSI, qui sont des signatures génomiques associées à l'instabilité génomique et à la présentation de néo-antigènes cancéreux.

TruSight Oncology Comprehensive est un test qualitatif de profilage génomique complet (CGP) par séquençage de nouvelle génération (NGS) qui évalue de façon extensive les variants génomiques dans un large panel de gènes liés au cancer énumérés dans le Tableau 2. Le test détecte de petits variants dans 517 gènes, ainsi que des amplifications génétiques, des fusions et des variants d'épissage, comme indiqué dans le Tableau 2. Le test fournit une couverture de séquence de codage pour tous les gènes sauf TERT, où seule la région du promoteur est couverte, et évalue le score TMB et le statut MSI. Les cibles de ces tests comprennent du contenu cité par les organisations professionnelles et des directives majeures des États-Unis. Les publications de consortiums indépendants et la recherche pharmaceutique de phase finale ont également influencé la conception du test TSO Comprehensive.

Pour obtenir une liste des régions exclues de la définition des variants, consulter la *TruSight Oncology Comprehensive liste d'interdiction complète (document n° 200009524)* disponible sur le site d'assistance Illumina.

Dans le Tableau 2, les catégories de types de variants suivantes sont identifiées : Petit variant de l'ADN (S), amplification du gène (A), fusion (F) et variant d'épissage (Sp). Les petits variants d'ADN comprennent les SNV, les MNV, ainsi que les insertions et les délétions.

Tableau 2 TSO Comprehensive (EU) Panel de gènes de test

n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant
1	25	ABL1	S	176	2 261	FGFR3	S, F	351	7 849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2 264	FGFR4	S	352	55 193	PBRM1	S
3	84 142	ABRAXAS1	S	178	2 271	FH	S	353	5 133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201 163	FLCN	S	354	80 380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2 313	FLI1	S	355	5 156	PDGFRA	S
6	25 960	ADGRA2	S	181	2 321	FLT1	S	356	5 159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2 322	FLT3	S	357	5 163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2 324	FLT4	S	358	5 170	PDPK1	S
9	10 000	AKT3	S	184	3 169	FOXA1	S	359	5 241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84 295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2 308	FOXO1	S	361	8 929	PHOX2B	S
12	139 285	AMER1	S	187	27 086	FOXP1	S	362	5 287	PIK3C2B	S
13	29 123	ANKRD11	S	188	10 818	FRS2	S	363	5 288	PIK3C2G	S
14	22 852	ANKRD26	S	189	8 880	FUBP1	S	364	5 289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2 534	FYN	S	365	5 290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2 559	GABRA6	S	366	5 291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2 623	GATA1	S	367	5 293	PIK3CD	S
18	10 139	ARFRP1	S	193	2 624	GATA2	S	368	5 294	PIK3CG	S
19	8 289	ARID1A	S	194	2 625	GATA3	S	369	5 295	PIK3R1	S

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant
20	57 492	ARID1B	S	195	2 626	GATA4	S	370	5 296	PIK3R2	S
21	196 528	ARID2	S	196	2 627	GATA6	S	371	8 503	PIK3R3	S
22	84 159	ARID5B	S	197	348 654	GEN1	S	372	5 292	PIM1	S
23	171 023	ASXL1	S	198	79 018	GID4	S	373	5 336	PLCG2	S
24	55 252	ASXL2	S	199	2 735	GLI1	S	374	10 769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2 767	GNA11	S	375	5 366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10 672	GNA13	S	376	5 378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2 776	GNAQ	S	377	5 395	PMS2	S
28	6 790	AURKA	S	203	2 778	GNAS	S	378	10 957	PNRC1	S
29	9 212	AURKB	S	204	2 874	GPS2	S	379	5 424	POLD1	S
30	8 312	AXIN1	S	205	26 585	GREM1	S	380	5 426	POLE	S
31	8 313	AXIN2	S	206	2 903	GRIN2A	S	381	5 468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2 913	GRM3	S	382	8 493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2 932	GSK3B	S	383	5 518	PPP2R1A	S
34	8 314	BAP1	S	209	3 020	H3F3A	S	384	5 520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3 021	H3F3B	S	385	5 537	PPP6C	S
36	27 113	BBC3	S	211	440 093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8 915	BCL10	S	212	3 082	HGF	S	387	80 243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3 006	HIST1H1C	S	388	5 573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3 017	HIST1H2BD	S	389	5 584	PRKCI	S
40	10 018	BCL2L11	S	215	8 350	HIST1H3A	S	390	5 591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8 358	HIST1H3B	S	391	5 071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8 352	HIST1H3C	S	392	5 652	PRSS8	S
43	54 880	BCOR	S	218	8 351	HIST1H3D	S	393	5 727	PTCH1	S
44	63 035	BCORL1	S	219	8 353	HIST1H3E	S	394	5 728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8 968	HIST1H3F	S	395	5 781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8 355	HIST1H3G	S	396	5 789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8 357	HIST1H3H	S	397	5 802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8 354	HIST1H3I	S	398	11 122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8 356	HIST1H3J	S	399	9 444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333 932	HIST2H3A	S	400	11 021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126 961	HIST2H3C	S	401	5 879	RAC1	S
52	23 476	BRD4	S	227	653 604	HIST2H3D	S	402	5 885	RAD21	S
53	83 990	BRIP1	S	228	8 290	HIST3H3	S	403	10 111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6 927	HNF1A	S	404	5 888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3 190	HNRNPK	S	405	5 890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10 481	HOXB13	S	406	5 889	RAD51C	S
57	84 433	CARD11	S	232	3 265	HRAS	S	407	5 892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3 283	HSD3B1	S	408	5 893	RAD52	S

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant
59	865	CBFB	S	234	3 320	HSP90AA1	S	409	8 438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23 308	ICOSLG	S	410	5 894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3 399	ID3	S	411	5 903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3 417	IDH1	S	412	5 914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3 418	IDH2	S	413	5 921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3 459	IFNGR1	S	414	5 925	RB1	S
65	29 126	CD274	S	240	3 479	IGF1	S	415	8 241	RBM10	S
66	80 381	CD276	S	241	3 480	IGF1R	S	416	9 401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3 481	IGF2	S	417	5 966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9 641	IKBKE	S	418	5 979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10 320	IKZF1	S	419	6 009	RHEB	S
70	79 577	CDC73	S	245	3 586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3 575	IL7R	S	421	253 260	RICTOR	S
72	51 755	CDK12	S	247	3 623	INHA	S	422	6 016	RIT1	S
73	1 019	CDK4	S	248	3 624	INHBA	S	423	54 894	RNF43	S
74	1 021	CDK6	S	249	3 631	INPP4A	S	424	6 098	ROS1	S, F
75	1 024	CDK8	S	250	8 821	INPP4B	S	425	8 986	RPS6KA4	S
76	1 026	CDKN1A	S	251	3 643	INSR	S	426	6 198	RPS6KB1	S
77	1 027	CDKN1B	S	252	3 660	IRF2	S	427	6 199	RPS6KB2	S
78	1 029	CDKN2A	S	253	3 662	IRF4	S	428	57 521	RPTOR	S
79	1 030	CDKN2B	S	254	3 667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1 031	CDKN2C	S	255	8 660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1 050	CEBPA	S	256	3 716	JAK1	S	431	23 429	RYBP	S
82	1 058	CENPA	S	257	3 717	JAK2	S	432	6 389	SDHA	S
83	1 106	CHD2	S	258	3 718	JAK3	S	433	54 949	SDHAF2	S
84	1 108	CHD4	S	259	3 725	JUN	S	434	6 390	SDHB	S
85	1 111	CHEK1	S	260	7 994	KAT6A	S	435	6 391	SDHC	S
86	11 200	CHEK2	S	261	5 927	KDM5A	S	436	6 392	SDHD	S
87	23 152	CIC	S	262	8 242	KDM5C	S	437	26 040	SETBP1	S
88	64 326	COP1	S	263	7 403	KDM6A	S	438	29 072	SETD2	S
89	1 387	CREBBP	S	264	3 791	KDR	S	439	23 451	SF3B1	S
90	1 399	CRKL	S	265	9 817	KEAP1	S	440	10 019	SH2B3	S
91	64 109	CRLF2	S	266	3 792	KEL	S	441	4 068	SH2D1A	S
92	1 436	CSF1R	S	267	3 799	KIF5B	S, F	442	55 164	SHQ1	S
93	1 441	CSF3R	S	268	3 815	TROUSSE	S	443	9 353	SLIT2	S
94	1 452	CSNK1A1	S	269	9 314	KLF4	S	444	84 464	SLX4	S
95	10 664	CTCF	S	270	89 857	KLHL6	S	445	4 087	SMAD2	S
96	1 493	CTLA4	S	271	4 297	KMT2A	S	446	4 088	SMAD3	S
97	1 495	CTNNA1	S	272	3 845	KRAS	S	447	4 089	SMAD4	S

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant
98	1 499	CTNNB1	S	273	3 916	LAMP1	S	448	6 597	SMARCA4	S
99	8 452	CUL3	S	274	9 113	LATS1	S	449	6 598	SMARCB1	S
100	1 523	CUX1	S	275	26 524	LATS2	S	450	6 602	SMARCD1	S
101	7 852	CXCR4	S	276	4 004	LMO1	S	451	8 243	SMC1A	S
102	1 540	CYLD	S	277	53 353	LRP1B	S	452	9 126	SMC3	S
103	1 616	DAXX	S	278	4 067	LYN	S	453	6 608	SMO	S
104	54 165	DCUN1D1	S	279	8 216	LZTR1	S	454	9 627	SNCAIP	S
105	4 921	DDR2	S	280	9 863	MAGI2	S	455	8 651	SOCS1	S
106	51 428	DDX41	S	281	10 892	MALT1	S	456	6 663	SOX10	S
107	1 665	DHX15	S	282	5 604	MAP2K1	S	457	64 321	SOX17	S
108	23 405	DICER1	S	283	5 605	MAP2K2	S	458	6 657	SOX2	S
109	22 894	DIS3	S	284	6 416	MAP2K4	S	459	6 662	SOX9	S
110	3 337	DNAJB1	S	285	4 214	MAP3K1	S	460	23 013	SPEN	S
111	1 786	DNMT1	S	286	9 175	MAP3K13	S	461	8 405	SPOP	S
112	1 788	DNMT3A	S	287	9 020	MAP3K14	S	462	6 708	SPTA1	S
113	1 789	DNMT3B	S	288	4 216	MAP3K4	S	463	6 714	SRC	S
114	84 444	DOT1L	S	289	5 594	MAPK1	S	464	6 427	SRSF2	S
115	1 871	E2F3	S	290	5 595	MAPK3	S	465	10 274	STAG1	S
116	8 726	EED	S	291	4 149	MAX	S	466	10 735	STAG2	S
117	51 162	EGFL7	S	292	4 170	MCL1	S	467	6 774	STAT3	S
118	1 956	EGFR	S, F, Sp	293	9 656	MDC1	S	468	6 775	STAT4	S
119	1 964	EIF1AX	S	294	4 193	MDM2	S	469	6 776	STAT5A	S
120	1 974	EIF4A2	S	295	4 194	MDM4	S	470	6 777	STAT5B	S
121	1 977	EIF4E	S	296	9 968	MED12	S	471	6 794	STK11	S
122	6 921	ELOC	S	297	100 271 849	MEF2B	S	472	83 931	STK40	S
123	27 436	EML4	S, F	298	4 221	MEN1	S	473	51 684	SUFU	S
124	56 946	EMSY	S	299	4 233	MET	S, A, Sp	474	23 512	SUZ12	S
125	2 033	EP300	S	300	23 269	MGA	S	475	6 850	SYK	S
126	4 072	EPCAM	S	301	4 286	MITF	S	476	6 872	TAF1	S
127	2 042	EPHA3	S	302	4 292	MLH1	S	477	6 926	TBX3	S
128	2 044	EPHA5	S	303	4 300	MLLT3	S	478	6 929	TCF3	S
129	2 045	EPHA7	S	304	4 352	MPL	S	479	6 934	TCF7L2	S
130	2 047	EPHB1	S	305	4 361	MRE11	S	480	7 012	TERC	S
131	2 064	ERBB2	S, A	306	4 436	MSH2	S	481	7 015	TERT	S
132	2 065	ERBB3	S	307	4 437	MSH3	S	482	80 312	TET1	S
133	2 066	ERBB4	S	308	2 956	MSH6	S	483	54 790	TET2	S
134	2 067	ERCC1	S	309	4 485	MST1	S	484	7 030	TFE3	S
135	2 068	ERCC2	S	310	4 486	MST1R	S	485	7 037	TFRC	S
136	2 071	ERCC3	S	311	2 475	MTOR	S	486	7 046	TGFBR1	S

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant	n°	ID Entrez	Gène	Type de variant
137	2 072	ERCC4	S	312	4 595	MUTYH	S	487	7 048	TGFBR2	S
138	2 073	ERCC5	S	313	4 602	MYB	S	488	55 654	TMEM127	S
139	2 078	ERG	S, F	314	4 609	MYC	S	489	7 113	TMPRSS2	S, F
140	54 206	ERRFI1	S	315	4 610	MYCL	S	490	7 128	TNFAIP3	S
141	2 099	ESR1	S, F	316	4 613	MYCN	S	491	8 764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4 615	MYD88	S	492	7 150	TOP1	S
143	2 115	ETV1	S, F	318	4 654	MYOD1	S	493	7 153	TOP2A	S
144	2 118	ETV4	S, F	319	4 665	NAB2	S	494	7 157	TP53	S
145	2 119	ETV5	S	320	4 683	NBN	S	495	8 626	TP63	S
146	2 120	ETV6	S	321	8 202	NCOA3	S	496	7 186	TRAF2	S
147	2 130	EWSR1	S	322	9 611	NCOR1	S	497	84 231	TRAF7	S
148	2 146	EZH2	S	323	257 194	NEGR1	S	498	7 248	TSC1	S
149	54 855	FAM46C	S	324	4 763	NF1	S	499	7 249	TSC2	S
150	2 175	FANCA	S	325	4 771	NF2	S	500	7 253	TSHR	S
151	2 176	FANCC	S	326	4 780	NFE2L2	S	501	7 307	U2AF1	S
152	2 177	FANCD2	S	327	4 792	NFKBIA	S	502	7 422	VEGFA	S
153	2 178	FANCE	S	328	7 080	NKX2-1	S	503	7 428	VHL	S
154	2 188	FANCF	S	329	4 824	NKX3-1	S	504	79 679	VTCN1	S
155	2 189	FANCG	S	330	4 851	NOTCH1	S	505	8 838	WISP3	S
156	55 215	FANCI	S	331	4 853	NOTCH2	S	506	7 490	WT1	S
157	55 120	FANCL	S	332	4 854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4 855	NOTCH4	S	508	7 514	XPO1	S
159	2 195	FAT1	S	334	4 869	NPM1	S	509	7 516	XRCC2	S
160	55 294	FBXW7	S	335	4 893	NRAS	S	510	10 413	YAP1	S
161	2 246	FGF1	S	336	3 084	NRG1	S, F	511	7 525	YES1	S
162	2 255	FGF10	S	337	64 324	NSD1	S	512	57 621	ZBTB2	S
163	2 259	FGF14	S	338	4 914	NTRK1	S, F	513	51 341	ZBTB7A	S
164	9 965	FGF19	S	339	4 915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2 247	FGF2	S	340	4 916	NTRK3	S, F	515	7 764	ZNF217	S
166	8 074	FGF23	S	341	9 688	NUP93	S	516	80 139	ZNF703	S
167	2 248	FGF3	S	342	256 646	NUTM1	S	517	8 233	ZRSR2	S
168	2 249	FGF4	S	343	5 058	PAK1	S	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.
169	2 250	FGF5	S	344	5 063	PAK3	S	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.
170	2 251	FGF6	S	345	57 144	PAK5	S	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.
171	2 252	FGF7	S	346	79 728	PALB2	S	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.
172	2 253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.
173	2 254	FGF9	S	348	5 077	PAX3	S, F	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.
174	2 260	FGFR1	S, F	349	5 079	PAX5	S	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.
175	2 263	FGFR2	S, F	350	5 081	PAX7	S	S.O.	S.O.	S.O.	S.O.

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

Principes de procédures

Le test TSO Comprehensive (EU) est un test distribué qui est effectué manuellement en utilisant l'acide nucléique extrait comme matériau d'entrée. L'ADN et/ou l'ARN extraits du tissu fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE) sont utilisés pour préparer des bibliothèques, qui sont ensuite enrichies pour les gènes liés au cancer- et séquencées sur le Instrument NextSeq 550Dx.

Le test TSO Comprehensive (EU) implique les processus suivants.

- **Préparation et enrichissement de la bibliothèque** : pour l'ARN, 40 ng au total sont convertis en ADN complémentaire double brin (ADNc). Pour l'ADN génomique (ADNg), 40 ng d'ADNg sont cisaillés en petits fragments. Les adaptateurs universels pour le séquençage sont ligaturés sur les fragments d'ADNc et d'ADNg. Les séquences d'adaptateurs P5 et P7 sont incorporées dans chaque bibliothèque pour permettre la capture de fragments de bibliothèque à la surface de la flow cell pendant le séquençage. Les adaptateurs comprennent des séquences d'index i5 et i7 pour identifier chaque échantillon individuel et, dans le cas de bibliothèques d'échantillons d'ADNg, des molécules individuelles à l'aide d'identifiants moléculaires uniques (UMI). Les bibliothèques sont ensuite enrichies pour les gènes d'intérêt spécifiques à l'aide d'une méthode basée sur la capture. Les séquences de sondes biotinylées qui couvrent les régions génétiques d'intérêt ciblées par le test sont hybridées aux bibliothèques. Les sondes et les bibliothèques ciblées hybrides sont isolées des bibliothèques non ciblées par capture avec des particules magnétiques de streptavidine. Les bibliothèques enrichies ciblées sont lavées et amplifiées. La quantité de chaque bibliothèque enrichie est ensuite normalisée à l'aide d'une méthode basée sur les billes pour assurer une représentation égale dans les bibliothèques regroupées pour le séquençage.
- **Séquençage et analyse principale** : les bibliothèques normalisées enrichies sont regroupées et agglomérées sur une flow cell, puis séquencées à l'aide d'une chimie de séquençage par synthèse (SBS) sur le NextSeq 550Dx. La chimie SBS utilise une méthode de terminaison réversible pour détecter les bases de désoxynucléotides triphosphates (dNTP) uniques marquées par fluorescence lorsqu'elles sont incorporées dans les brins d'ADN en croissance. Pendant chaque cycle de séquençage, un seul dNTP est ajouté à la chaîne d'acide nucléique. L'étiquette dNTP sert de terminaison pour la polymérisation. Après chaque incorporation de dNTP, le colorant fluorescent est imagé pour identifier la base, puis clivé pour permettre l'incorporation du nucléotide suivant. Quatre dNTP liées au terminateur réversibles (A, G, T et C) sont présentes sous forme de molécules uniques et distinctes. Par conséquent, la concurrence naturelle minimise les biais d'incorporation. Pendant l'analyse principale, les définitions de base sont effectuées directement à partir des mesures d'intensité du signal pendant chaque cycle de séquençage, ce qui entraîne un séquençage base-par-base. Un score de qualité est attribué à chaque définition de base.
- **Analyse secondaire** : le Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) réside sur l'instrument NextSeq 550Dx dans le logiciel Local Run Manager pour faciliter la configuration de l'analyse TSO Comprehensive (EU) et effectuer l'analyse secondaire des résultats de séquençage. L'analyse secondaire comprend la validation du traitement de l'analyse et du contrôle qualité, suivie du démultiplexage, de la génération de fichiers FASTQ, de l'alignement et de la définition des variants. Le démultiplexage sépare les données des bibliothèques groupées en fonction des index de séquence uniques qui ont été ajoutés pendant la procédure de préparation de la bibliothèque. Des fichiers intermédiaires

FASTQ sont générés et contiennent les lectures de séquençage pour chaque échantillon et les scores de qualité, à l'exclusion des lectures des clusters qui n'ont pas réussi le filtre. Les lectures de séquençage sont ensuite alignées sur un génome de référence pour identifier une relation entre les séquences et un score est attribué en fonction des régions de similarité. Les lectures alignées sont écrites dans des fichiers au format BAM. Le logiciel de test utilise des algorithmes distincts pour les bibliothèques générées à partir d'échantillons d'ADN et/ou d'ARN afin de définir les petits variants d'ADN, les amplifications de gènes, la TMB et la MSI pour les échantillons d'ADN, et les fusions et les variants d'épissage pour les échantillons d'ARN. Plusieurs sorties sont générées par le module logiciel d'analyse, y compris les métriques de séquençage et les fichiers de format de définition de variant (VCF). Les fichiers VCF contiennent des renseignements sur les variants que l'on trouve à des positions spécifiques dans un génome de référence. Des métriques de séquençage et des fichiers de sortie individuels sont générés pour chaque échantillon. Consulter le *Guide de flux de travail du Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661)* pour plus de détails sur l'analyse secondaire et tertiaire.

- **Analyse tertiaire** : l'analyse tertiaire, effectuée par le Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU), consiste en des calculs de TMB et de MSI, un diagnostic compagnon, le profilage tumoral des variants en deux niveaux de signification clinique à l'aide d'une base de connaissances (KB) et du type de tissu, et la génération de rapports de résultats. Le profilage tumoral peut également être défini en tant que profilage génomique complet. Les résultats des variants interprétés et les résultats des biomarqueurs TMB et MSI sont résumés dans le rapport des résultats TSO Comprehensive (EU).

Limites de la procédure

Destiné au diagnostic *in vitro* uniquement.

- À utiliser uniquement sur ordonnance. Le test doit être utilisé conformément aux réglementations du laboratoire clinique.
- Les résultats génomiques énumérés dans le Tableau 2 de l'utilisation prévue ne sont ni prescriptifs ni concluants pour l'utilisation indiquée d'un produit thérapeutique spécifique.
- Pour les variants énumérés dans le rapport de résultats TSO Comprehensive (EU) sous Résultats génomiques avec preuve de signification clinique (niveau 2) et Résultats génomiques avec signification clinique potentielle (niveau 3), aucune validation clinique n'a été effectuée.
- Les décisions relatives aux soins et au traitement des patients doivent être fondées sur le jugement médical indépendant du médecin traitant, en tenant compte de toutes les informations applicables concernant l'état du patient, telles que les antécédents du patient et de sa famille, les examens physiques, les informations provenant d'autres tests diagnostiques et les préférences du patient, conformément au traitement recommandé dans une communauté donnée.
- La qualité de l'échantillon FFPE est très variable. Les échantillons qui n'ont pas subi de procédures de fixation standard peuvent ne pas générer d'acides nucléiques extraits qui répondent aux exigences de contrôle qualité du test (*Contrôle qualité* à la page 83). Les blocs FFPE conservés depuis plus de cinq ans ont démontré une validité moindre.

- La performance de TSO Comprehensive (EU) dans les échantillons obtenus auprès de patients ayant subi une greffe d'organe ou de tissu n'a pas été évaluée.
- Des quantités élevées de tissu nécrotique (≥ 23 %) peuvent interférer avec la capacité du test TSO Comprehensive (EU) à détecter les amplifications génétiques et les fusions d'ARN.
- La mutation du facteur somatique peut ne pas être détectée de manière fiable si le contenu tumoral (par zone) est inférieur à 20 %.
- Un résultat de stabilité des microsatellites (MS-Stable) peut être peu fiable si la teneur tumorale est inférieure à 30 %. Un résultat de microsatellite élevé (MSI-élevé) est correct, quelle que soit la teneur tumorale.
- L'hémoglobine associée aux tissus diminue les lectures justificatives des variants d'épissage MET.
- Dans les génomes fortement réorganisés avec délétions et perte d'hétérozygotie, le logiciel TSO Comprehensive (EU) peut classer par erreur un échantillon d'ADN comme contaminé (CONTAMINATION_SCORE > 3 106 et valeur p > 0,049).
- Un résultat négatif n'exclut pas la présence d'une mutation inférieure aux limites de détection (LoD) du test.
- La sensibilité pour la détection de petits variants d'ADN peut être affectée par :
  - Contexte génomique de faible complexité.
  - Augmentation de la longueur des variants.
- Les scores TMB peuvent être inexacts dans les contextes suivants :
  - À mesure que le contenu tumoral atteint des niveaux où les fréquences des allèles germinaux et variants somatiques (VAF) convergent.
  - Dans les populations peu représentées dans les bases de données publiques.
- Les amplifications génétiques sont les seuls variants de nombre de copies signalées par TSO Comprehensive (EU). Les délétions génétiques ne sont pas rapportées par le test.
- Les algorithmes de définition de fusion dans le logiciel de test TSO Comprehensive (EU) pourraient ne pas prendre en compte les preuves des lectures qui s'étendent en dehors des limites génétiques annotées.
- La sensibilité pour la détection des fusions peut être affectée :
  - Par une faible complexité de la bibliothèque, ce qui entraîne une diminution des lectures de support en raison des écarts dans le flux de travail du test (par exemple, suivre les étapes de mélange dans *Dénaturation et recuit de l'ARN* à la page 45).
  - Lorsqu'un seul gène couvre les deux points de rupture.
  - Dans les cas où plusieurs points de rupture de fusion sont proches l'un de l'autre avec un ou plusieurs partenaires, les points de rupture et les partenaires multiples peuvent être signalés comme un point de rupture et un partenaire uniques.
  - Par petites tailles d'insert médianes. Une taille d'insert médiane minimale de 80 bp est requise, mais la sensibilité diminue dans la plage de 80 à 100 bp.
  - Par faible complexité de séquence ou contexte génomique homologue autour des points d'arrêt de fusion.

- La résolution des gènes impliqués dans une fusion peut être affectée lorsque des points de rupture de fusion se produisent dans des régions génomiques contenant des gènes qui se chevauchent. Le test rapportera tous les gènes, délimités par des points-virgules, si plusieurs gènes se chevauchent un point de rupture.
- Une couverture incohérente dans la région du promoteur TERT peut entraîner un Aucun résultat en raison de la faible profondeur.
- Les erreurs d'annotation ou de KB peuvent entraîner un résultat faux positif ou faux négatif, y compris la liste d'un variant au mauvais niveau (entre les Résultats génomiques avec preuve de signification clinique [niveau 2] et les Résultats génomiques avec signification clinique potentielle [niveau 3]), ou les informations d'annotation dans le rapport peuvent être incorrectes. Les variants rapportés dans les résultats CDx ne sont pas affectés par des erreurs d'annotation ou de KB. Il existe une possibilité d'erreur à partir des trois sources suivantes :
  - Annotation de variant TSO Comprehensive (EU). Il existe un taux d'erreur d'environ 0,0027 % basé sur une analyse de 2 448 350 variants de COSMIC v92, il existe donc une faible possibilité d'erreur.
  - Erreur KB due au processus de conservation.
  - La pertinence du contenu de la base de connaissances évolue au fil du temps. Le rapport reflète les connaissances au moment où la version KB a été choisie.
- TSO Comprehensive (EU) est conçu pour rapporter les variants somatiques lors du rapport des variants avec des preuves de signification clinique ou des variants avec une signification clinique potentielle. En tant que test de tumeur uniquement, la déclaration des variants germinaux (héréditaires) est possible mais involontaire. TSO Comprehensive (EU) utilise un KB pour rapporter les variants sans annoter explicitement s'ils sont d'origine germinale ou somatique.
- La KB inclut uniquement les associations thérapeutiques, diagnostiques et pronostiques qui sont pertinentes pour les variants présents dans un néoplasme malin solide établi. Les associations de sensibilité ou de risque de cancer ne sont pas incluses dans la KB.
- Le tableau suivant affiche les modifications nucléotidiques pour trois variants RET que le test ne peut pas détecter. D'autres changements nucléotidiques peuvent être détectés pour le même changement d'acides aminés.

Tableau 3 Changements nucléotidiques pour trois variants RET

Changement d'acides aminés	Chr*	Position	Allèle de référence	Alternative
p.E632_A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG
				TGCGGCCG
p.E632_C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA
				CAAAGAGA
				CAAAAAGG
				CCAAAAGG
				CTAAGAGG

* Chr = Chromosome

Composants du produit

Le test TSO Comprehensive (EU) se compose des composants suivants :

- Trousse TruSight Oncology Comprehensive (EU)(Illumina réf. catalogue 20063092) : la trousse comprend des réactifs avec un volume suffisant pour générer 24 bibliothèques d'ADN et 24 librairies d'ARN. Ce volume inclut des échantillons et des contrôles du patient. Contrôles vendus séparément (consulter la section *Réactifs requis, non fournis* à la page 18).
- Base de connaissances : mise à jour régulièrement et téléchargeable sur le Illumina portail Lighthouse.
- Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illumina réf. catalogue 20051843), qui comprend les composants suivants :
  - Forfaits de réclamations TSO Comprehensive
  - Suite logicielle TSO Comprehensive
  - Kit USB TSO Comprehensive

Un technicien de maintenance Illumina installe la version appropriée du Module d'analyse TSO Comprehensive (EU) sur le Local Run ManagerInstrument NextSeq 550Dx. Pour des informations sur le module d'analyse, consulter le Guide de flux de travail du Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661).

Réactifs

Réactifs fournis

Les réactifs suivants sont fournis avec la TSO Comprehensive (EU) trousse.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, réf. 20031127

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, de l'ADN polymérase, de la RNase H et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des hexamères aléatoires	-25 °C à -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de la reverse transcriptase	-25 °C à -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (congélation), réf. 20031118

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant du DNA polymerase T4 et du polynucléotide kinase	-25 °C à -15 °C

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	-25 °C à -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de la ligase	-25 °C à -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides de séquençage universel	-25 °C à -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides de séquençage universel	-25 °C à -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	-25 °C à -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de l'ADN polymérase et des nucléotides	-25 °C à -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (réfrigérer), réf. 20031119

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Solution aqueuse contenant des billes magnétiques	2 °C à 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Solution Tris EDTA	2 °C à 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, réf. 20031120

Ingrédients actifs : solution aqueuse tamponnée contenant des primers oligonucléotidiques à code-barres individuel.

⚠ ATTENTION

Utiliser des primers d'indexation unique (UPxx) pour les échantillons d'ARN ou d'ADN. Ne pas combiner les primers d'indexation CPxx et UPxx dans la même bibliothèque.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, réf. 20031126

Ingrédients actifs : solution aqueuse tamponnée contenant des primers oligonucléotidiques à code-barres individuel.

⚠ ATTENTION

Utiliser les primers d'indexation combinatoires (CPxx) pour les échantillons d'ADN uniquement. Ne pas combiner les primers d'indexation CPxx et UPxx dans la même bibliothèque.

Primer d'indexation	Référence	Quantité	Volume	Index i7	Séquence	Index i5	Séquence	Température de stockage
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C à -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C à -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C à -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C à -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C à -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C à -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C à -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C à -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C à -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C à -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C à -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C à -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C à -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C à -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C à -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C à -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigérer), réf. 20031123

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant du formamide et des sels	2 °C à 8 °C

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et des billes paramagnétiques en phase solide enrobées de streptavidine de manière covalente	2 °C à 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Solution d'hydroxyde de sodium	2 °C à 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Solution aqueuse tamponnée	2 °C à 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des billes paramagnétiques en phase solide	2 °C à 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, 2-Mercaptoéthanol et formamide	2 °C à 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	2 °C à 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Solution aqueuse contenant des billes magnétiques	2 °C à 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (congélation), réf. 20031121

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant des oligonucléotides	-25 °C à -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels	-25 °C à -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant un détergent	-25 °C à -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de l'ADN polymérase et des nucléotides	-25 °C à -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant les primers P5 et P7	-25 °C à -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels, 2- Mercaptoéthanol et formamide	-25 °C à -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 ou PhiX)	20031492	1	10 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant de l'ADN génomique PhiX	-25 °C à -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, réf. 20031122

Réactif	Référence	Quantité	Volume	Ingrédients actifs	Température de stockage
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Groupe de sondes oligonucléotidiques	-25 °C à -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Groupe de sondes oligonucléotidiques	-25 °C à -15 °C

Réactifs requis, non fournis

Réactifs pré-amplification

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents : consulter la section *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28, pour les exigences en matière de réactifs.
- DNA and RNA Quantification Reagents : consulter la section *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28 pour les exigences en matière de réactifs.
- Contrôles TruSight Oncology :
  - TruSight Oncology DNA Control (Illumina réf. catalogue 20065041)
  - TruSight Oncology RNA Control (Illumina réf. catalogue 20065042)
- Éthanol (EtOH) 100 % (200 degrés), qualité biologie moléculaire
- Eau exempte de RNase/DNase

Réactifs post-amplification

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina réf. catalogue 20028871)
  - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
  - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- EtOH 100 % (200 degrés), qualité biologie moléculaire
- Eau exempte de RNase/DNase

Stockage et manipulation des réactifs

Les boîtes de réactifs suivantes sont expédiées congelées. À conserver entre -25 °C et -15 °C.

Boîte	Référence	Zone du laboratoire
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp Library Prep (congélation)	20031118	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp Enrichment (congélation)	20031121	Post-amplification
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amplification

ATTENTION

Ne stockez pas les réactifs dans une unité de stockage hors-gel ou dans les compartiments de la porte du réfrigérateur.

Les boîtes de réactifs suivantes sont expédiées sur des blocs de gel pour maintenir une température comprise entre 0 °C et 10 °C. À conserver entre 2 °C et 8 °C.

Boîte	Référence	Zone du laboratoire
TruSight Oncology Comp Library Prep (réfrigérer)	20031119	Pré-amplification
TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigérer)	20031123	Post-amplification

ATTENTION

Ne pas congeler les réactifs contenant des billes (LNB1, SPB et SMB).

- Des changements dans l'apparence physique des réactifs peuvent indiquer une détérioration des matériaux. En cas de changements dans l'apparence physique (par exemple, une modification de la couleur du réactif ou un trouble), n'utilisez pas les réactifs.
- FSM, SSM, ERA1-B et TCB1 peuvent contenir des particules liées au produit. Suivre les directives de manipulation pour chaque réactif. Après avoir effectué les étapes de mélange FSM et SSM, les particules blanches restantes liées au produit n'auront pas d'impact sur les performances.
- La stabilité du test TSO Comprehensive (EU) a été évaluée et les performances démontrées pour un maximum de quatre utilisations de la trousse. Les réactifs sont stables lorsqu'ils sont conservés aux températures indiquées jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la boîte.

Équipements et matériaux

Équipement et matériaux nécessaires, non fournis

Équipement et matériaux pré-amplification

Équipement	Fournisseur
Appareil à ultrason avec accessoires associés Consulter *Paramètres de configuration de l'appareil à ultrasons pour la fragmentation de l'ADN* à la page 23.	Fournisseur de laboratoire général

Équipement	Fournisseur
Thermocycleur présentant les caractéristiques suivantes : • Couvercle chauffant pouvant être réglé sur 30 °C et 100 °C (ou éteint s'il n'est pas capable d'atteindre 30 °C) • Comprend une plage de température allant de 4 °C à 99 °C • Précision de la température de ±0,25 °C • Compatible avec les plaques PCR 96 puits, 0,2 ml • Consulter la section *Fréquence de rampe du thermocycleur* à la page 25	Fournisseur de laboratoire général
Vortex	Fournisseur de laboratoire général
Incubateurs pour micro-échantillons (2) avec inserts pour plaques MIDI 96 puits (2)	Fournisseur de laboratoire général
Microcentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Centrifugeuse de plaques avec les caractéristiques suivantes : • Compatible avec les microplaques 96 puits • Capacité de 280 × g (+/- 10 %)	Fournisseur de laboratoire général
Agitateur de plaques avec les caractéristiques suivantes : • Orbite 2 mm • Peut agiter à 1 200 tr/min et 1 800 tr/min	Fournisseur de laboratoire général
Coin ou rouleau d'étanchéité	Fournisseur de laboratoire général
Support magnétique présentant les caractéristiques suivantes : • Conçu pour la précipitation/séparation des billes paramagnétiques • Aimants sur le côté du support (pas sur le bas) • Compatible avec les plaques MIDI 96 puits	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes de précision capables de délivrer avec précision des volumes compris entre 2 µl et 1 000 µl avec les caractéristiques suivantes : • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 0,02 µl • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 0,1 µl, 0,2 µl, ou 0,5 µl • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 1 µl ou 2 µl Les pipettes doivent être étalonnées régulièrement et leur précision doit être de l'ordre de 5 % du volume indiqué.	Fournisseur de laboratoire général
Pipette-aide	Fournisseur de laboratoire général

Équipement	Fournisseur
Bloc de glace ou bloc réfrigérant	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes sérologiques de 10 ml	Fournisseur de laboratoire général
Joints adhésifs pour plaques 96 puits présentant les caractéristiques suivantes : • Pelable • Convient pour les plaques PCR à jupe complète ou partielle • Adhésif résistant à de multiples changements de température de -20 °C à 100 °C • Exempt de DNase/RNase	Fournisseur de laboratoire général
Tubes de microcentrifugation de 1,7 ml de capacité, sans nucléase	Fournisseur de laboratoire général
Réservoirs à réactifs sans nucléase (compartiment jetable, 50 ml) (ou équivalent)	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 15 ml	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 50 ml	Fournisseur de laboratoire général
Embouts de pipette compatibles résistants aux aérosols	Fournisseur de laboratoire général
Plaques de stockage 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)	Fisher Scientific, référence AB-0859 ou équivalent
Plaques PCR 96 puits compatibles avec thermocycleur, 0,2 ml (puits en polypropylène)	Fournisseur de laboratoire général

Équipement et matériaux post-amplification

Équipement	Fournisseur
Instrument NextSeq 550Dx	Illumina, réf. catalogue 20005715
Centrifugeuse de plaques avec les caractéristiques suivantes : • Compatible avec les microplaques 96 puits • Capacité de 280 × g (+/- 10 %)	Fournisseur de laboratoire général

Équipement	Fournisseur
Thermocycleur présentant les caractéristiques suivantes : • Couvercle chauffant (100 °C) • Comprend une plage de température allant de 4 °C à 99 °C • Précision de la température de ±0,25 °C • Compatible avec les plaques PCR 96 puits, 0,2 ml • Consulter la section *Fréquence de rampe du thermocycleur* à la page 25	Fournisseur de laboratoire général
Vortex	Fournisseur de laboratoire général
Incubateur à micro-échantillons avec insert pour plaques MIDI 96 puits	Fournisseur de laboratoire général
Bloc de chaleur sèche avec les spécifications suivantes : • Plage de température de 25 °C à 99 °C • Précision de la température ±5 °C • S'assurer que les tubes de microcentrifugeuse sont compatibles avec le bloc thermique	Fournisseur de laboratoire général
Agitateur de plaques avec les caractéristiques suivantes : • Orbite 2 mm • Peut agiter à 1 200 tr/min et 1 800 tr/min	Fournisseur de laboratoire général
Microcentrifugeuse	Fournisseur de laboratoire général
Coin ou rouleau d'étanchéité	Fournisseur de laboratoire général
Support magnétique présentant les caractéristiques suivantes : • Conçu pour la précipitation/séparation des billes paramagnétiques • Aimants sur le côté du support (pas sur le bas) • Compatible avec les plaques MIDI 96 puits	Fournisseur de laboratoire général
Pipettes de précision capables de délivrer avec précision des volumes compris entre 2 µl et1 000 µl avec les caractéristiques suivantes : • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 0,02 µl • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 0,1 µl, 0,2 µl, ou 0,5 µl • Pipette monocanal ou multicanal avec incréments de 1 µl ou 2 µl Les pipettes doivent être étalonnées régulièrement et leur précision doit être de l'ordre de 5 % du volume indiqué.	Fournisseur de laboratoire général
Pipette-aide	Fournisseur de laboratoire général

Équipement	Fournisseur
Pipettes sérologiques de 10 ml	Fournisseur de laboratoire général
Joints adhésifs pour plaques 96 puits présentant les caractéristiques suivantes : • Pelable • Convient pour les plaques PCR à jupe complète ou partielle • Adhésif résistant à de multiples changements de température de -20 °C à 100 °C • Exempt de DNase/RNase	Fournisseur de laboratoire général
Tubes de microcentrifugation de 2 ml de capacité, sans nucléase	Fournisseur de laboratoire général
Tubes de microcentrifugation de 1,7 ml de capacité, sans nucléase	Fournisseur de laboratoire général
Réservoirs à réactifs sans nucléase (compartiment jetable, 50 ml) (ou équivalent)	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 15 ml	Fournisseur de laboratoire général
Tubes coniques de 50 ml	Fournisseur de laboratoire général
Embouts de pipette compatibles résistants aux aérosols	Fournisseur de laboratoire général
Plaques de stockage 96 puits, 0,8 ml (plaques MIDI)	Fisher Scientific, référence AB-0859 ou équivalent
Plaques PCR 96 puits compatibles avec thermocycleur, 0,2 ml (puits en polypropylène)	Fournisseur de laboratoire général
Bloc de glace ou bloc réfrigérant	Fournisseur de laboratoire général

Paramètres de configuration de l'appareil à ultrasons pour la fragmentation de l'ADN

La fragmentation ou le cisaillement de l'ADN influence les performances du test en déterminant la distribution de la taille du fragment, ce qui affecte à son tour la couverture du séquençage. Plusieurs configurations d'ultrasons ciblés ont été évaluées et optimisées pour le test TSO Comprehensive (EU) (Tableau 4).

- Le temps de cisaillement a été ajusté pour maximiser la mesure MEDIAN_EXON_COVERAGE décrite dans la section *Contrôle qualité* à la page 83. Les temps de cisaillement (consulter le Tableau 4) et les résultats MEDIAN_INSERT_SIZE différaient selon les configurations.

- Les configurations 1 à 4 et 6 ont été testées avec des tubes en verre à 8 bandes. La Configuration 5 utilisait un seul tube en verre. Les capacités volumiques des tubes sont indiquées dans le Tableau 4.
- L'optimisation des configurations 3 à 6 (volumes de bain-marie plus faibles) a utilisé des pulsations.
- Les configurations 3 à 5 ont été cisaillées dans des tubes de plus petit volume. Les capacités volumiques des tubes affectent les paramètres de cisaillement.
- La configuration 4 (transducteur en ligne, volume du bain-marie de taille moyenne, eau dégazée) a nécessité un long délai de pulsation (40 secondes) pour obtenir un MEDIAN_EXON_COVERAGE similaire à celui des configurations 1 et 2 à une entrée nominale de 40 ng.
- Les paramètres optimaux pour la configuration 3 ont entraîné une distribution légèrement plus importante de la taille du fragment par rapport aux autres configurations (MEDIAN_INSERT_SIZE était d'environ 5 à 10 paires de base plus grandes).
- Les configurations 3 et 5 utilisaient de l'eau non dégazée et le plus petit volume de bain-marie.
- Les configurations 3 et 5 ont nécessité une entrée d'ADN plus importante (50 ng pour la configuration 3, 60 ng pour la configuration 5) pour obtenir un MEDIAN_EXON_COVERAGE similaire aux 4 autres configurations, qui ont utilisé l'entrée nominale de 40 ng.
- Les configurations 3 et 5 présentent plus de dommages et/ou de dénaturation et donc une masse efficace réduite de molécules d'ADNdb utilisables pour la préparation de la bibliothèque.

Centrifuger les tubes de cisaillement pendant le processus de récupération pour s'assurer que le volume spécifié est récupéré, car toute perte de matériau peut nuire aux performances.

Tableau 4 Configurations de l'ultrasonoriseur focalisé évaluées

Paramètre	Configuration					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Transducteur	Ligne	Point	Point	Ligne	Point	Ligne
Volume du bain-marie	5 L	5 L	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 L
Eau dégazée	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Oui
Refroidisseur d'eau	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Température du bain-marie	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Puissance incidente de crête (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% facteur de charge	30	10	30	25	20	25
Cycles par salves	200	200	1 000	1 000	1 000	600
Pulsations (salves de 10 secondes)	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Délai entre les pulsations	S.O.	S.O.	10 s	40 s	10 s	10 s
Temps de cisaillement	250 s	280 s	200 s[1]	320 s[2]	200 s[1]	320 s[2]
Traitement des échantillons	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Taille du lot	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Taille d'échantillon du tube en verre 8-Strip	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Tube unique (50 µl)	130 µl (ou plaque de 96 microTUBE)
Dithering	S.O.	S.O.	S.O.	3 mm Y @ 20 mm/s	S.O.	1,5 mm Y @ 10 mm/s
Équivalent d'entrée d'ADN (pour couverture médiane des exons)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

[1] Le temps de cisaillement de 200 secondes se compose de salves de 10 secondes avec 20 répétitions.
[2] Le temps de cisaillement de 320 secondes se compose de salves de 10 secondes avec 32 répétitions.

Fréquence de rampe du thermocycleur

La vitesse de rampe du cyclage thermique affecte les métriques de CQ du test (les sites MSI utilisables, la cible CNV du nombre médian de bacs, la taille médiane de l'insert [ARN]) et les lectures justificatives pour les variants

d'épissage et les fusions. Il est recommandé d'optimiser la fréquence de rampe du thermocycleur. Par exemple, un modèle testé a été ajusté à partir d'une vitesse de rampe par défaut (et maximale) de 5 °C/s à 3 °C/s pour obtenir des résultats comparables à ceux d'autres modèles avec des vitesses de rampe par défaut plus faibles.

Prélèvement, transport et stockage des échantillons

Suivre les procédures standard lors du prélèvement, du transport, du stockage et du traitement des échantillons.

Exigences relatives aux échantillons

Tissu FFPE

Le test TSO Comprehensive (EU) nécessite un ARN de 40 ng et/ou un ADN de 40 ng extrait du tissu FFPE. L'utilisation de l'ARN et de l'ADN permet l'analyse de tous les types de variants revendiqués. Le tissu doit être fixé à l'aide d'un fixateur de formol adapté aux analyses moléculaires (par exemple, formol tamponné neutre à 10 %). Le tissu ne doit pas être décalcifié. Avant d'effectuer le test TSO Comprehensive (EU), l'échantillon de tissu doit être examiné par un pathologiste pour s'assurer qu'il est approprié pour ce test. Un minimum de 20 % de contenu tumoral (par zone) est nécessaire pour détecter les mutations du facteur somatique. La détection fiable du statut MSI sur une variété d'échantillons nécessite un minimum de 30 % de contenu tumoral. Si un échantillon est testé avec moins de 30 % de contenu tumoral pour déterminer les résultats avec d'autres types de variants, le résultat MS-Stable pourrait être non fiable. Un résultat MSI-Élevé est correct quel que soit le contenu tumoral.

Le contenu tumoral pour les amplifications génétiques et les variants d'ARN dépend de l'étendue de l'amplification ou de l'expression de fusion (consulter la section *Contenu de la tumeur* à la page 107).

Pour une probabilité élevée d'extraction de 40 ng d'ARN et de 40 ng d'ADN de différents types de tissus solides, le volume de tissu recommandé est ≥ 1,0 mm^3. Ce volume équivaut à une surface tissulaire viable cumulée de ≥ 200 mm^2 en utilisant des coupes de 5 µm d'épaisseur, ou ≥ 100 mm^2 en utilisant des coupes de 10 µm d'épaisseur. La surface tissulaire cumulée est la somme de la surface tissulaire viable dans toutes les coupes soumises pour extraction. Par exemple, une surface tissulaire cumulée de 200 mm^2 pourrait être obtenue en extrayant quatre coupes de 5 µm avec une surface tissulaire de 50 mm^2 chacune ou cinq coupes de 10 µm avec une surface tissulaire de 20 mm^2 chacune. La nécrose tissulaire pourrait diminuer le rendement en acide nucléique. Pour minimiser la possibilité de résultats faussement négatifs, le tissu peut être macrodisséqué pour obtenir un contenu tumoral viable souhaitable.

Des quantités élevées de tissu nécrotique (≥ 23 % par zone) peut interférer avec la capacité du test TSO Comprehensive (EU) à détecter les amplifications génétiques et les fusions d'ARN. Si la section d'échantillon contient plus de 23 % de nécrose dans la surface totale du tissu, le tissu nécrotique doit être macrodisséqué. Si le laboratoire analyse l'ARN avec le test, les tissus présentant de l'hémoglobine doivent être évités ou minimisés lors de la réalisation de coupes à partir du bloc de tissu. Consulter la section *Substances interférentes* à la page 98.

Le tissu FFPE monté sur lame peut être conservé jusqu'à 28 jours à température ambiante.

Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques

- Extraire l'ARN et l'ADN des échantillons de tissu FFPE à l'aide de trousses d'extraction disponibles dans le commerce. Les différences entre les trousses d'extraction peuvent avoir un impact sur les performances. Consulter la section *Évaluation de la trousse d'extraction d'acide nucléique* à la page 96.
- Ne pas augmenter la protéinase K ou l'enzyme équivalente pendant l'extraction à partir de la concentration standard fournie dans une trousse d'extraction. Consulter la section *Substances interférentes* à la page 98.
- Conserver l'acide nucléique de stock extrait en suivant les instructions du fabricant de la trousse d'extraction.
- Conserver l'ADN extrait jusqu'à 28 jours entre -25 °C et -15 °C.
- Conserver l'ARN extrait jusqu'à 28 jours entre -85 °C et -65 °C.
- Pour éviter les changements de concentration au fil du temps, mesurer l'ADN et l'ARN dans les 28 jours précédant le début de la préparation de la bibliothèque. Quantifier l'ARN et l'ADN à l'aide d'une méthode de quantification fluorométrique qui utilise des colorants de liaison à l'acide nucléique. La concentration en acide nucléique doit être la moyenne d'au moins trois mesures.
- Le test nécessite 40 ng de chaque échantillon d'ARN préparé dans de l'eau exempte de RNase/DNase (non fournie), avec un volume final de 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Le test nécessite 40 ng de chaque échantillon d'ADNg avec une concentration d'extraction minimale de 3,33 ng/µl. Le cisaillement nécessite un volume final de 52 µl (0,77 ng/µl) avec un minimum de 40 µl de TEB (fourni) utilisé comme diluant.

Stockage de bibliothèque

Stocker les bibliothèques dans des plaques PCR à faible liaison pendant 7 à 32 jours, selon le type de bibliothèque (consulter le Tableau 5).

Tableau 5 Temps de stockage de la bibliothèque

Type de bibliothèque	Plaque	Nombre de jours	Température de stockage
ADNc	PCF PCR	≤ 7	-25 °C à -15 °C
ADNg fragmenté	LP PCR	≤ 7	-25 °C à -15 °C
Pré-enrichissement	ALS PCR	≤ 30	-25 °C à -15 °C
Post-enrichissement	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C à -15 °C
PCR post-enrichissement	PL PCR	≤ 30	-25 °C à -15 °C
Normalisé	NL PCR	≤ 32	-25 °C à -15 °C

Avertissements et Précautions

Sécurité

⚠ AVERTISSEMENT

Cet ensemble de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des dommages corporels peuvent survenir en cas d'inhalation, d'ingestion, de contact avec la peau ou les yeux. La ventilation doit être appropriée pour la manipulation de matières dangereuses dans les réactifs. Porter un équipement de protection, y compris des lunettes de protection, des gants et une blouse de laboratoire adaptés au risque d'exposition. Manipuler les réactifs usagés comme des déchets chimiques et les mettre au rebut conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour de plus amples informations relatives à l'environnement, à la santé et à la sécurité, consultez la SDS à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

- **Manipuler tous les échantillons comme s'ils étaient connus pour être infectieux.**
- **Prendre les précautions de routine en laboratoire. Ne pas injecter avec la bouche. Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées. Porter des gants jetables et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de test. Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé des échantillons et des réactifs de test.**

Laboratoire

- Pour éviter la contamination, organiser le laboratoire avec un flux de travail unidirectionnel. Les zones de pré-amplification et de post-amplification doivent disposer d'un équipement dédié (par exemple, pipettes, embouts de pipette, vortex et centrifugeuse). Pour éviter le transfert du produit d'amplification ou de la sonde, éviter de retourner dans la zone de pré-amplification après avoir pénétré dans la zone de post-amplification.
- Effectuer les étapes de l'Indexation PCR et d'enrichissement dans une zone post-amplification pour éviter le transfert du produit d'amplification.
- Les procédures de préparation de la bibliothèque nécessitent un environnement exempt de RNase/DNase. Décontaminer soigneusement les zones de travail avec un nettoyant inhibant la RNase/DNase. Utiliser des plastiques certifiés exempts de DNase, RNase et ADN génomique humain.
- Pour les procédures post-amplification, nettoyer soigneusement les surfaces de travail et l'équipement avant et après chaque procédure avec une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 0,5 % fraîchement préparée. Laisser la solution entrer en contact avec les surfaces pendant 10 minutes, puis essuyer soigneusement avec de l'alcool éthylique ou isopropylique à 70 %.
- Utiliser des tubes de microcentrifugation, des plaques, des embouts de pipette et des réservoirs sans nucléase.

- Utiliser un équipement étalonné tout au long du test. S'assurer d'étalonner l'équipement aux vitesses, températures et volumes spécifiés dans ce protocole.
- Utiliser des pipettes de précision pour assurer une distribution précise des réactifs et des échantillons. Étalonner régulièrement conformément aux spécifications du fabricant.
- Utiliser les directives suivantes lorsque vous utilisez des pipettes multicanaux :
  - Pipeter un minimum de ≥ 2 µl.
  - S'assurer que les embouts barrière sont bien ajustés et adaptés à la marque et au modèle de pipettes multicanaux.
  - Fixer les embouts avec un mouvement de roulement pour vous assurer que tous les embouts sont bien fixés.
  - Aspirer à un angle de 90°, avec des niveaux de volume de liquide équivalents sur tous les embouts.
  - Mélanger tous les composants après l'administration en pipetant le mélange maître de haut en bas.
  - Après la distribution, s'assurer que le liquide est entièrement distribué à partir de chaque buse.
- S'assurer d'utiliser l'équipement spécifié pour le test et de définir les programmes comme indiqué.
- Les températures indiquées pour le thermocycleur et l'incubateur de micro-échantillons indiquent la température de réaction, pas nécessairement la température définie de l'équipement.

Test

- Éviter la contamination croisée.
  - Suivre les bonnes pratiques de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs.
  - Utiliser du matériel de laboratoire consommable frais et des embouts de pipette frais entre les échantillons et entre les réactifs de distribution.
  - Utiliser des embouts résistants aux aérosols pour réduire le risque de contamination croisée.
  - Utiliser un flux de travail unidirectionnel pour passer des zones de pré-amplification aux zones de post-amplification.
  - Manipuler et ouvrir un seul primer d'indexation à la fois. Reboucher chaque tube index immédiatement après utilisation. Des bouchons supplémentaires sont fournis dans la trousse.
  - Changer souvent de gants et s'ils entrent en contact avec des primers d'indexation ou des échantillons.
  - Retirer les tubes de primer d'indexation inutilisés de la zone de travail.
  - Ne pas remettre les réactifs dans les tubes de stockage après utilisation avec une bande de tube, un compartiment ou un réservoir.
  - Mélanger les échantillons avec une pipette et centrifuger la plaque si indiqué.
  - Utiliser un agitateur de microplaques. Ne pas mélanger les plaques à l'aide d'un vortex.
- Ne pas échanger les composants du test de différents lots de trousses de réactifs. Les lots de trousses de réactifs sont identifiés sur l'étiquette de la boîte de trousses de réactifs et sur la fiche de lot de référence.

- Des pratiques de laboratoire adéquates sont nécessaires pour empêcher les nucléases et les produits PCR de contaminer les réactifs, l'instrument, les échantillons et les bibliothèques. La contamination par nucléase et produit PCR peut causer des résultats inexacts et peu fiables.
- Un type de plaque approprié est nécessaire pour une performance et un stockage optimaux du test. S'assurer de suivre les instructions de transfert de plaque dans le *Mode d'emploi* à la page 40.
- Le défaut de suivre les procédures, telles que spécifiées, peut causer des résultats erronés ou une diminution significative de la qualité de la bibliothèque.
- À moins qu'un point d'arrêt de sécurité ne soit spécifié dans le *Mode d'emploi* à la page 40, passez immédiatement à l'étape suivante.
- Stocker les réactifs et composants du test à la température spécifiée dans des zones de pré-amplification et de post-amplification désignées.
- Ne stockez pas les réactifs dans une unité de stockage hors gel ou dans les compartiments de la porte du réfrigérateur.
- Ne pas congeler les réactifs contenant des billes (LNB1, SPB et SMB).
- Ne pas utiliser de réactifs qui ont été conservés de manière incorrecte.
- Ne pas s'écarter des procédures de mélange et de manipulation spécifiées pour chaque réactif. Un mélange inadéquat ou un mélange excessif des réactifs à l'aide d'un vortex peut entraîner l'échec des résultats de l'échantillon.
- FSM, SSM, ERA1-B et TCB1 peuvent contenir des particules liées au produit. Suivre les directives de manipulation pour chaque réactif. Après avoir effectué les étapes de mélange FSM et SSM, les particules blanches restantes liées au produit n'auront pas d'impact sur les performances.
- Préparer les mélanges réactionnels frais et jeter le volume restant après utilisation.
- Préparer toujours de l'éthanol frais à 80 % avec de l'eau exempte de RNase/DNase pour les étapes de lavage. L'éthanol peut absorber l'eau de l'air, ce qui peut avoir une incidence sur les résultats. Éliminer l'éthanol à 80 % après utilisation conformément aux réglementations locales, nationales et/ou fédérales.
- Transférer le volume d'éluat spécifié. Le transfert d'un volume d'éluat inférieur au volume spécifié pendant les étapes d'élution pourrait avoir un impact sur les résultats.
- Suivre les directives suivantes pour les ultrasons. S'assurer de suivre les instructions du fabricant.
  - Charger lentement l'ADNg dans le tube à ultrasons pour éviter de créer des bulles. Des bulles excessives ou un espace d'air dans le tube de cisaillement pourraient entraîner une fragmentation incomplète.
  - Distribuer lentement dans les tubes à ultrasons et éviter les éclaboussures.
  - Pour éviter le déplacement du liquide et la perte d'échantillon, ne pas insérer l'embout de la pipette au fond du tube à ultrasons lors du retrait de l'ADN fragmenté.
- Ne pas pipeter moins de 2 µl d'échantillon.
- Ne pas utiliser de bac pour distribuer les réactifs pour les étapes nécessitant l'ajout de moins de 10 µl de matériau dans chaque puits d'échantillon.

- Utiliser une pipette à embouts fins pour transférer les échantillons d'ADNg fragmenté des tubes de l'appareil à ultrasons vers la plaque de préparation de la bibliothèque (LP).
- Ne pas combiner les adaptateurs SUA1 et UMI.
- Utiliser des adaptateurs SUA1 avec des échantillons d'ARN.
- Utiliser des adaptateurs UMI avec des échantillons d'ADN.
- Attribuer différents primers d'indexation à chaque échantillon de bibliothèque pour identifier de manière unique chaque bibliothèque lorsqu'elle est regroupée pour le séquençage sur une seule flow cell.
- Ne pas combiner les primers d'indexation CPxx et UPxx dans la même bibliothèque.
- Les mauvaises correspondances entre les échantillons et les primers d'indexation entraînent des résultats erronés en raison de la perte de l'identification positive de l'échantillon. Saisir les ID d'échantillon et attribuer des index dans le Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) avant de commencer la préparation de la bibliothèque. Enregistrer les ID d'échantillon, l'indexation et l'orientation du puits de la plaque pour référence pendant la préparation de la bibliothèque.
- Pour les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ARN, utiliser uniquement les index UPxx.
- Pour les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ADN, utiliser les index UPxx ou CPxx.
- Séquencer un maximum de 8 bibliothèques d'ARN et 8 bibliothèques d'ADN par flow cell. Séquencer au moins trois bibliothèques. Suivre les directives de la section *Nombre de bibliothèques et sélection des index* à la page 36.
- Après l'étape de liaison dans *Capture des cibles un* à la page 62 et *Capture des cibles deux* à la page 66, passer immédiatement à l'étape de lavage pour éviter que les billes ne sèchent.
- Pendant les étapes de lavage, retirer tout l'éthanol à 80 % du fond des puits. Il a été démontré que l'éthanol résiduel a un impact sur les résultats.
- Pour des performances de test optimales, suivre le nombre de lavages indiqué dans le *Mode d'emploi* à la page 40.
- Pendant la procédure *Normalisation des bibliothèques* à la page 73, remettre en suspension le culot de library beads pour obtenir une densité de grappe constante sur la flow cell.
- Signaler immédiatement tout incident grave relatif à ce produit à Illumina et aux Autorités compétentes des États membres dans lequel l'utilisateur et le patient sont établis.

Notes de procédure

- Le flux de travail TSO Comprehensive (EU) peut être effectué selon le calendrier suivant :
  - Jour 1 : synthèse de l'ADNc à partir d'échantillons d'ARN, fragmentation de l'ADN des échantillons d'ADNg, préparation de la bibliothèque et début de l'hybridation de nuit (première).
  - Jour 2 : enrichissement, normalisation des bibliothèques enrichies et chargement des bibliothèques sur le Instrument NextSeq 550Dx.

S'il n'est pas possible d'exécuter le flux de travail TSO Comprehensive (EU) conformément à ce calendrier, plusieurs points d'arrêt de sécurité sont spécifiés tout au long du protocole. À moins qu'un point d'arrêt de sécurité ne soit spécifié dans le protocole, passer immédiatement à l'étape suivante.

- Les bibliothèques dérivées des échantillons d'ARN et d'ADN peuvent être préparées simultanément dans des puits distincts.
- Les tableaux de préparation du mélange maître comprennent le surplus de volume pour s'assurer qu'il y a suffisamment de volume pour le nombre d'échantillons traités.
- Utiliser de l'eau de qualité moléculaire exempte de nucléases.
- Après l'ajout du réactif, rincer l'embout en aspirant et en distribuant une fois dans le puits approprié de la plaque, sauf indication contraire dans la procédure.
- La température ambiante est définie entre 15 °C et 30 °C.
- Les réactifs, échantillons et bibliothèques doivent être conservés au froid à certaines étapes du mode d'emploi. Cela correspond à une conservation sur glace ou équivalent.

Programmes du thermocycleur

- Programmer les programmes du thermocycleur sur l'équipement de pré-amplification et de post-amplification avant de démarrer le protocole.
- S'assurer que les plaques PCR s'insèrent parfaitement dans le thermocycleur.
- Utiliser les plaques recommandées par le fabricant du thermocycleur.

Scellage et décellement de la plaque

- Toujours sceller les plaques avec un nouveau joint de plaque adhésif. Ne pas réutiliser les joints.
- Pour sceller la plaque, appliquez solidement le couvercle adhésif sur la plaque à l'aide d'une cale ou d'un rouleau d'étanchéité.
- Toujours sceller la plaque à 96 puits avec un nouveau joint de plaque adhésif avant les étapes suivantes du protocole.
  - Étapes d'agitation de la plaque
  - Étapes de centrifugation
  - Étapes du cyclage thermique
  - Hybridations
  - Stockage à long terme
- S'assurer que les bords et les puits sont scellés pour réduire le risque de contamination croisée et d'évaporation.
- Placer la plaque sur une surface plane avant de retirer lentement le joint.
- Avant le décollement, si du liquide ou de la condensation est observé sur le joint ou les parois latérales des puits de la plaque, centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.

- Utiliser des joints de plaque adhésifs efficaces entre -20 °C et 100 °C, et adaptés aux plaques PCR à jupe ou jupe partielle.

Équipement

- S'assurer que le personnel du laboratoire est familiarisé avec les instructions du fabricant pour l'utilisation et l'entretien de tout l'équipement avant de commencer le test.

Type de plaque et transferts de plaque

- Un type de plaque approprié est nécessaire pour une performance et un stockage optimaux du test.
- Lors du transfert de volumes entre les plaques, transférer le volume spécifié de chaque puits d'une plaque vers le puits correspondant de la plaque de destination.
- Les pipettes multicanaux peuvent être utilisées lors du transfert d'échantillons entre des barrettes de tubes ou des plaques.
- Suivre les directives suivantes lors de l'agitation des plaques.
  - Utiliser un agitateur pour plaques pour agiter les plaques. Ne pas mélanger les plaques à l'aide d'un vortex.
  - Agiter les plaques PCR à 1 200 tr/min.
  - Agiter les plaques MIDI à 1 800 tr/min.
  - Suivre les instructions du fabricant pour s'assurer que l'agitateur de plaque maintient fermement la plaque.

Centrifugation

- Lorsque les instructions du protocole indiquent de centrifuger brièvement, centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.
- Si du liquide est observé sur le joint ou sur les côtés d'un puits, centrifuger la plaque à 280 × g pendant 1 minute.

Manipulation des réactifs

- Reboucher hermétiquement tous les tubes de réactif immédiatement après utilisation pour limiter l'évaporation et éviter toute contamination.
- Ramener les réactifs à la température de stockage spécifiée lorsqu'ils ne sont plus nécessaires pour une procédure.
- Suivre la préparation du réactif qui précède chaque section de procédure du *Mode d'emploi* à la page 40.
- S'assurer de préparer le volume requis de mélange maître, de mélange d'élution et d'éthanol à 80 % pour le nombre d'échantillons que vous traitez.

- Les volumes fournis dans les tableaux de mélange maître et de solution contiennent un excédent. Les calculs de volume excédentaire sont les suivants.
  - Tableau 14
    - Volume de FSM = (7,2 µl) x (nombre d'échantillons + contrôles) x (1,25).
    - Volume de RVT = (0,8 µl) x (nombre d'échantillons + contrôles) x (1,25).
  - Tableau 21
    - Volume d'ERA1-B = (7,2 µl) x (nombre de bibliothèques) x (1,20).
    - Volume d'ERA1-A = (2,8 µl) x (nombre de bibliothèques) x (1,20).
  - Tableau 29
    - Volume d'EE2 = (20,9 µl) x (nombre de bibliothèques) x (1,364).
    - Volume de HP3 = (1,1 µl) x (nombre de bibliothèques) x (1,364).
  - Tableau 30
    - Volume d'EE2 = (20,9 µl) x (nombre de bibliothèques) x (1,364).
    - Volume de HP3 = (1,1 µl) x (nombre de bibliothèques) x (1,364).
  - Tableau 36
    - Volume de LNA1 = (38,1 µl) x (nombre de bibliothèques) x (2,0).
    - Volume de LNB1 = (6,9 µl) x (nombre de bibliothèques) x (2,0).
  - Tableau 37
    - Volume d'EE2 = (30,4 µl) x (nombre de bibliothèques) x (1,25).
    - Volume de HP3 = (1,6 µl) x (nombre de bibliothèques) x (1,25).

Jeux d'adaptateurs

- Le test TSO Comprehensive (EU) comprend des adaptateurs SUA1 et UMI.
- Les adaptateurs SUA1 sont destinés à être utilisés avec des échantillons d'ARN. Ne pas utiliser avec des échantillons d'ADN.
- Les adaptateurs UMI sont destinés à être utilisés avec des échantillons d'ADN. Ne pas utiliser avec des échantillons d'ARN.

Manipulation des billes

- Trois types de billes sont inclus dans le test TSO Comprehensive (EU) (SPB, SMB et LNB1). S'assurer que le bon type de bille est utilisé pendant la procédure.
- Effectuer le nombre correct de lavages pour chaque type de bille.
- S'assurer que les billes sont à température ambiante avant utilisation.
- Mélanger les billes pendant 1 minute avant utilisation pour garantir l'homogénéité.

- Suivre les directives suivantes lors du mélange des billes avec une pipette :
  - Utiliser une pipette et une taille d'embout adaptées au volume que vous mélangez.
  - Régler le volume à environ 50 à 75 % du volume de l'échantillon.
  - Pipeter lentement sans relâcher le piston.
  - Éviter les éclaboussures et l'introduction de bulles.
  - Positionner l'embout de la pipette au-dessus du culot et le distribuer directement dans le culot pour libérer les billes du puits ou du tube.
  - S'assurer que le culot de billes est complètement en solution. La solution doit avoir un aspect marron foncé et avoir une consistance homogène.
  - Évaluer si un culot de billes est présent. Aspirer avec précaution la solution de billes totales du puits dans l'embout et examiner le fond des puits.
- Si des billes sont aspirées dans les embouts de pipette pendant les étapes de séparation magnétique, les distribuer à nouveau dans le puits de la plaque sur le support magnétique. Attendre que le liquide soit clair (environ 2 minutes) avant de passer à l'étape suivante de la procédure.
- Lors du lavage des billes :
  - Utiliser le support magnétique recommandé pour la plaque.
  - Distribuer le liquide directement sur le culot de billes afin que les billes sur le côté des puits soient mouillées.
  - Maintenir la plaque sur le support magnétique jusqu'à ce que la procédure indique de la retirer.
  - Ne pas agiter la plaque sur le support magnétique.
  - Sur le support magnétique, ne pas déranger le culot de billes.
- Lors du lavage des billes ou du retrait du surnageant, incliner les embouts de pipette au fond des puits pour éviter de créer un vide et d'extraire la solution dans les filtres d'embouts de pipette.

Nombre de bibliothèques et sélection des index

Avant la configuration de l'analyse, planifier le nombre de bibliothèques d'échantillons et d'index d'échantillons pour l'analyse de séquençage. Les directives suivantes concernant le nombre d'échantillons comprennent les contrôles positifs, mais excluent les contrôles négatifs/sans modèle (NTC). Les NTC doivent être ajoutés à l'analyse prévue en tant qu'échantillon supplémentaire.

Pour TSO Comprehensive (EU), suivre les directives du Tableau 6 et du Tableau 7 pour déterminer le nombre de bibliothèques d'ARN et/ou d'ADN à séquencer sur une flow cell. Consulter le Tableau 6 si vous séquencez séparément des bibliothèques d'ARN *ou* d'ADN. Consulter le Tableau 7 si vous séquencez des bibliothèques d'ARN *et* d'ADN sur la même flow cell.

Tableau 6 Séquençage des bibliothèques d'ARN *ou* d'ADN

Type de bibliothèque	Minimum*	Maximum*
ARN uniquement	3	16
ADN uniquement	3	8

* Les NTC ne contribuent pas à la plexité.

Tableau 7 Séquençage des bibliothèques d'ARN *et* d'ADN sur la même flow cell

Type de bibliothèque	Minimum*	Maximum*
ARN	3	8
ADN	3	8

* Les NTC ne contribuent pas à la plexité.

Pour une utilisation optimale des réactifs lors du séquençage des bibliothèques d'ADN ***et*** d'ARN avec le TSO Comprehensive (EU) sur le Instrument NextSeq 550Dx, séquencer 8 bibliothèques d'ARN et 8 bibliothèques d'ADN par flow cell.

Les primers d'indexation identifient de manière unique chaque échantillon afin que les bibliothèques puissent être regroupées pour le séquençage sur une flow cell. Les combinaisons d'index compatibles s'affichent sur l'écran Create Run (Créer une analyse) pendant la configuration de l'analyse sur le Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Pendant la préparation de la bibliothèque, ajouter le primer d'indexation à chaque bibliothèque d'échantillons. ***Utiliser un mélange de primers d'indexation différent pour chaque bibliothèque d'échantillons.***

S'assurer que les primers d'indexation que vous utilisez avec les échantillons correspondent aux index que vous sélectionnez pour l'analyse avec le Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). ***Les mauvaises correspondances entraînent des résultats erronés en raison de la perte de l'identification positive de l'échantillon.***

Il existe deux types d'index dans le test TSO Comprehensive (EU).

- **Index UPxx** : utiliser les index UPxx pour les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ARN ou d'ADN.
- **Index CPxx** : utiliser les index CPxx pour les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ADN. Ne pas utiliser les index CPxx pour les bibliothèques dérivées de l'ARN ou pour le séquençage de seulement trois bibliothèques d'ADN au total.

Lors du séquençage de seulement trois bibliothèques, les éléments suivants sont requis :

- Les bibliothèques doivent être entièrement composées d'ADN ou d'ARN.
- Ne pas utiliser les ensembles d'index CPxx.
- L'un des ensembles d'index UPxx suivants est nécessaire pour fournir une diversité suffisante :
  - UP01, UP02 et UP03
  - UP04, UP05 et UP06
  - UP07, UP08 et UP09
  - UP10, UP11 et UP12

  Par exemple, la première bibliothèque se voit attribuer UP01, la deuxième bibliothèque UP02 et la troisième bibliothèque UP03.

TruSight Oncology Contrôles

TSO Comprehensive (EU) nécessite TruSight Oncology Controls, qui se compose du contrôle d'ADN TruSight Oncology et du contrôle d'TruSight Oncology ARN en tant que contrôles positifs. Inclure le contrôle d'ADN TruSight Oncology pour chaque série de séquençage d'ADN et le contrôle d'ARN TruSight Oncology pour chaque série de séquençage d'ARN dans un événement de préparation de bibliothèque donné (inclure également les contrôles pour les séries combinées d'ADN et d'ARN). Un contrôle positif unique est préparé pour chaque série de séquençage planifiée. Pour en savoir plus, consultez Notice TruSight Oncology Controls (document n° 200009919).

La quantité d'entrée de contrôle positif est de 40 ng pour l'ADN et l'ARN.

Inclure le NTC approprié dans chaque événement de préparation de la bibliothèque d'ARN et d'ADN. Le NTC est séquencé plusieurs fois dans un événement de préparation de bibliothèque. Suivre ces directives pour le TruSight Oncology Controls :

- Préparer les bibliothèques à partir de contrôles positifs et de contrôles sans modèle de la même manière que les échantillons.
- Utiliser TEB pour le NTC ADN.
- Utiliser de l'eau exempte de DNase/RNase pour le NTC ARN.
- Les contrôles positifs sont inclus dans l'exigence de bibliothèque maximale.
- Les NTC ne sont pas inclus dans les exigences minimales de la bibliothèque.
- Utiliser les index UP pour le NTC lors du séquençage d'uniquement 3 bibliothèques.
- Comme le NTC est séquencé à plusieurs reprises, les index sélectionnés pour ce contrôle ne peuvent pas être répétés dans l'événement de préparation de la bibliothèque.

Les tableaux suivants montrent des exemples de disposition des plaques pour la préparation de la bibliothèque. Chaque colonne numérotée représente une seule série de séquençage. Lors du séquençage des bibliothèques

d'ADN et d'ARN ensemble, chaque ensemble de colonnes correspondant représente une unique série de séquençage (par exemple, colonne 1 et colonne 7). Le NTC est séquencé pour chaque colonne ou ensemble de colonnes.

Tableau 8 Évènement de préparation de bibliothèque d'une série unique comprenant six échantillons de patients

	1	2	3	4	5	6	7
A	Contrôle de l'ADN Pos	vide	vide	vide	vide	vide	Contrôle de l'ARN Pos
B	ADN 1	vide	vide	vide	vide	vide	ARN 1
C	ADN 2	vide	vide	vide	vide	vide	ARN 2
D	ADN 3	vide	vide	vide	vide	vide	ARN 3
E	ADN 4	vide	vide	vide	vide	vide	ARN 4
F	ADN 5	vide	vide	vide	vide	vide	ARN 5
G	ADN 6	vide	vide	vide	vide	vide	ARN 6
H	ADN NTC	vide	vide	vide	vide	vide	NTC ARN

Tableau 9 Événement de préparation de la bibliothèque de trois séries comprenant 20 échantillons de patients

	1	2	3	4	5	6	7
A	Contrôle de l'ADN Pos	Contrôle de l'ADN Pos	Contrôle de l'ADN Pos	vide	Contrôle de l'ARN Pos	Contrôle de l'ARN Pos	Contrôle de l'ARN Pos
B	ADN 1	ADN 7	ADN 14	vide	ARN 1	ARN 7	ARN 14
C	ADN 2	ADN 8	ADN 15	vide	ARN 2	ARN 8	ARN 15
D	ADN 3	ADN 9	ADN 16	vide	ARN 3	ARN 9	ARN 16
E	ADN 4	ADN 10	ADN 17	vide	ARN 4	ARN 10	ARN 17
F	ADN 5	ADN 11	ADN 18	vide	ARN 5	ARN 11	ARN 18
G	ADN 6	ADN 12	ADN 19	vide	ARN 6	ARN 12	ARN 19
H	ADN NTC	ADN 13	ADN 20	vide	NTC ARN	ARN 13	ARN 20

Mode d’emploi

Une vue d’ensemble du flux de travail TSO Comprehensive (EU) est présentée sur la Figure 1 et la Figure 2.

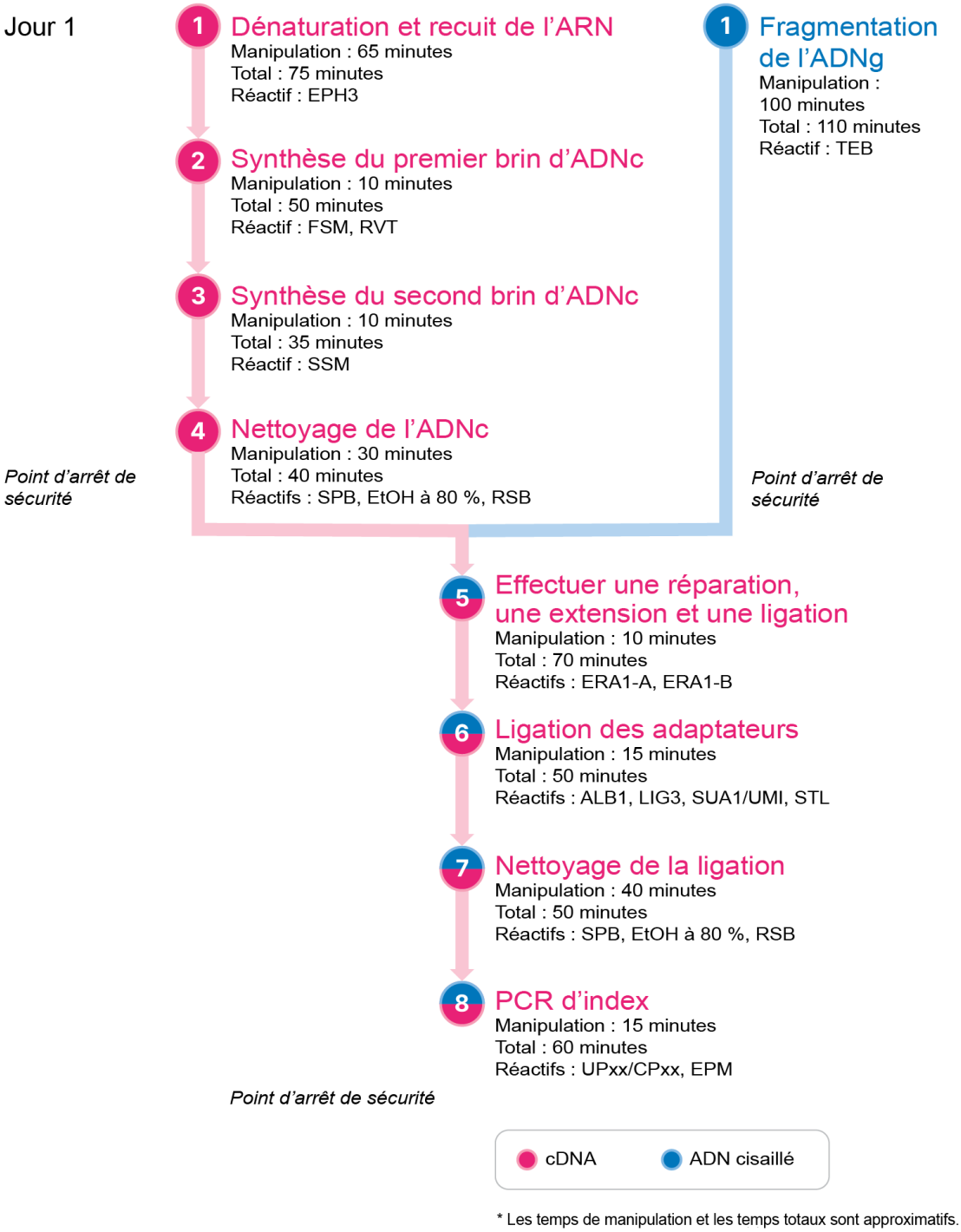
Flux de travail de préparation de la bibliothèque

La Figure 1 illustre le flux de travail de préparation de la bibliothèque pour TSO Comprehensive (EU). Les bibliothèques d’échantillons d’ARN et d’ADN peuvent être préparées simultanément dans des puits distincts. Les contrôles positifs et les contrôles sans modèle sont traités de la même manière que les échantillons. Les points d’arrêt de sécurité sont marqués entre les étapes.

Avant de démarrer le protocole, saisir les informations relatives à l’analyse et à l’échantillon dans le Module d’analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Consulter *Guide de flux de travail du Module d’analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661)*.

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L’EXPORTATION UNIQUEMENT.

Figure 1 TSO Comprehensive (EU) Flux de travail (Partie 1)



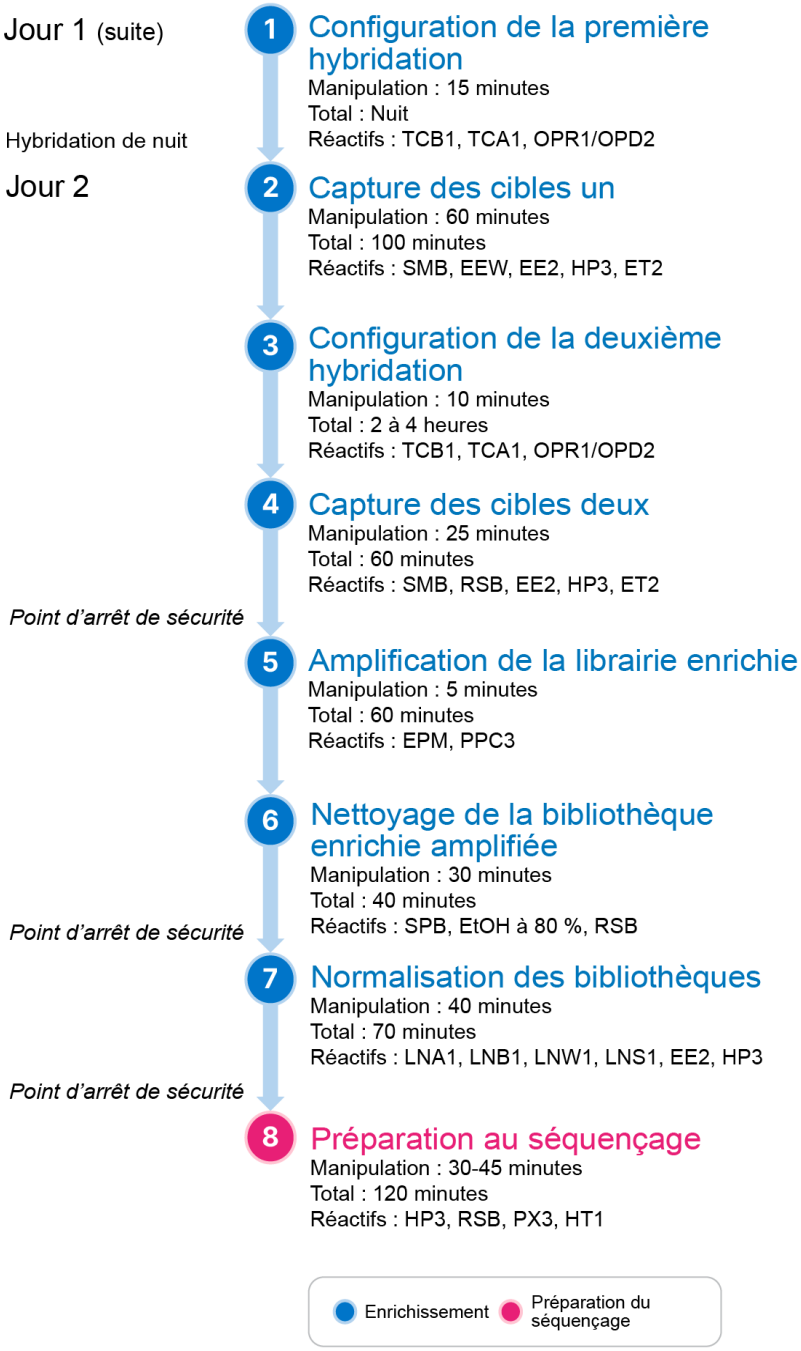
* Les temps de manipulation et les temps totaux sont approximatifs.

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

Flux de travail d'enrichissement

La Figure 2 illustre le flux de travail d'enrichissement pour TSO Comprehensive (EU). Les points d'arrêt de sécurité sont marqués entre les étapes.

Figure 2 TSO Comprehensive (EU) Flux de travail (Partie 2)



DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

Programmation des thermocycleurs

Avant de démarrer le test, enregistrer les programmes suivants sur les thermocycleurs avant et après amplification.

Tableau 10 Programmes du thermocycleur pré-amplification

Étape de la procédure	Nom du programme	Température du couvercle	Volume de réaction	Paramètres du thermocycleur
Dénaturation et recuit de l'ARN	LQ-ARN	100 °C	17 µl	• 65 °C pendant 5 minutes • 4 °C pendant 1 minute • Maintenir à 4 °C
Synthèse du premier brin d'ADNc	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C pendant 10 minutes • 42 °C pendant 15 minutes • 70 °C pendant 15 minutes • 4 °C pendant 1 minute • Maintenir à 4 °C
Synthèse du second brin d'ADNc	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C pendant 25 minutes • 4 °C pendant 1 minute • Maintenir à 4 °C

REMARQUE Si la température du couvercle pour le 2ndSS ne peut pas être réglée sur 30 °C, désactiver l'option de chauffage du couvercle préchauffé.

Tableau 11 Programmes du thermocycleur post-amplification

Étape de la procédure	Nom du programme	Température du couvercle	Volume de réaction	Paramètres du thermocycleur

Indexation PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C pendant 30 secondes
				• 15 cycles de :
				  • 98 °C pendant 10 secondes
				  • 60 °C pendant 30 secondes
				  • 72 °C pendant 30 secondes
				• 72 °C pendant 5 minutes
				• Maintenir à 10 °C

Étape de la procédure	Nom du programme	Température du couvercle	Volume de réaction	Paramètres du thermocycleur
Effectuer la première hybridation	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C pendant 10 minutes • 85 °C pendant 2 min 30 secondes • 75 °C pendant 2 min 30 secondes • 65 °C pendant 2 min 30 secondes • Maintenir à 57 °C pendant 8 à 24 heures
Effectuer une deuxième hybridation	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C pendant 10 minutes • 85 °C pendant 2 min 30 secondes • 75 °C pendant 2 min 30 secondes • 65 °C pendant 2 min 30 secondes • Maintenir à 57 °C pendant 1,5 à 4 heures

Amplifier la bibliothèque enrichie	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C pendant 30 s
				• 18 cycles de :
				  • 98 °C pendant 10 s
				  • 60 °C pendant 30 s
				  • 72 °C pendant 30 s
				• 72 °C pendant 5 min
				• Maintenir à 10 °C

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

⚠ ATTENTION

Toutes les procédures du flux de travail nécessitent un environnement sans RNase/DNase.

1. Décontaminer soigneusement les zones de travail avec un nettoyant inhibant la RNase/DNase.
2. S'assurer que les programmes du thermocycleur pré-amplification sont définis. Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.
3. Suivre les instructions du fabricant pour installer l'appareil à ultrasons.
4. Pour le traitement des échantillons d'ADN uniquement, passer directement à la section *Fragmentation de l'ADNg* à la page 50.
5. Retirer les contrôles ARN du stockage.
6. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (réf. 20031127)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
EPH3	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Dénaturation et recuit de l'ARN
FSM	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Synthèse du premier brin d'ADNc
RVT	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Synthèse du premier brin d'ADNc
SSM	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Synthèse du second brin d'ADNc

Tableau 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (réfrigérer) (réf. 20031119)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SPB (étiquette vert clair)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Nettoyage de l'ADNc
RSB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Nettoyage de l'ADNc

Dénaturation et recuit de l'ARN

Ce procédé dénature l'ARN purifié et primer avec des hexamères aléatoires en préparation de la synthèse de l'ADNc.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - EPH3 : Mettre de côté.
   - FSM : Mélanger à l'aide d'un vortex. Centrifuger brièvement, puis pipeter pour mélanger.
     Le réactif pourrait contenir des particules blanches liées au produit. Aucune action de l'utilisateur n'est requise. Il n'y a aucun impact sur les performances du produit.
   - RVT : Centrifuger brièvement, puis pipeter pour mélanger. Garder au froid.

   REMARQUE RVT est une solution visqueuse. Minimiser la formation de bulles pendant le pipetage.

2. Dans un tube de microcentrifugeuse, combiner les volumes suivants pour préparer un mélange maître FSM + RVT.

Tableau 14 Mélange maître FSM + RVT*

Composant du mélange maître	4 bibliothèques (µl)	8 bibliothèques (µl)	16 bibliothèques (µl)	24 bibliothèques (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section *Manipulation des réactifs* à la page 34 pour les calculs.

3. Pipeter 10 fois pour mélanger.
4. Garder le mélange maître FSM + RVT au froid jusqu'à la *Synthèse du premier brin d'ADNc* à la page 47.

Procédure

1. Garder les échantillons d'ARN extraits et les contrôles d'ARN au froid pendant la décongélation.
   Traiter les contrôles d'ARN comme des échantillons pour le reste du protocole.
2. Garder l'ARN au froid lorsqu'il n'est pas utilisé. Consulter les *Exigences relatives aux échantillons* à la page 27 pour quantifier les échantillons.
3. Pipeter chaque échantillon d'ARN 10 fois pour mélanger.
4. Utiliser de l'eau exempte de RNase/DNase pour préparer 40 ng de chaque échantillon d'ARN dans un volume final de 8,5 µl (4,7 ng/µl).
   Pour les contrôles d'ARN, utiliser la concentration indiquée sur l'étiquette du tube.
5. Étiqueter une nouvelle plaque CF PCR à 96 puits (fragments d'ADNc).
6. Ajouter 8,5 µl de chaque échantillon d'ARN dans un puits unique de la plaque CF PCR.
7. S'assurer que la disposition et les index de la plaque d'échantillon pour chaque échantillon correspondent à l'analyse prévue dans le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU) pendant la configuration de l'analyse.
8. Mélanger l'EPH3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
9. Ajouter 8,5 µl d'EPH3 dans chaque puits d'échantillon.
10. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CF PCR.

⚠ ATTENTION

Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.

11. Agiter à 1 200 tr/min pendant 1 minute.
12. Centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.
13. Placer sur le thermocycleur et exécuter le programme LQ-RNA.
    Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.
14. Lorsque les échantillons atteignent 4 °C, les maintenir enfoncés pendant 1 minute. Passer immédiatement à l'étape suivante.

Synthèse du premier brin d'ADNc

Ce processus inverse transcrit les fragments d'ARN amorcés avec des hexamères aléatoires dans l'ADNc du premier brin à l'aide de la reverse transcriptase.

Procédure

1. Retirer la plaque CF PCR du thermocycleur.
2. Pipeter 10 fois pour mélanger le mélange maître FSM + RVT. S'assurer que le mélange FSM + RVT est complètement homogène.
3. Ajouter 8 µl de mélange maître FSM + RVT dans chaque puits d'échantillon.
4. Pipeter 10 fois pour mélanger.
5. Jeter le mélange maître FSM + RVT restant.
6. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CF PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
7. Agiter à 1 200 tr/min pendant 1 minute.
8. Centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.
9. Placer sur un thermocycleur et exécuter le programme 1stSS.
   Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.
10. Lorsque les échantillons atteignent 4 °C, passer immédiatement à l'étape suivante.
    Les échantillons du premier brin peuvent être conservés à 4 °C pendant 5 minutes maximum.

Synthèse du second brin d'ADNc

Ce processus supprime le modèle d'ARN et synthétise l'ADNc double brin.

Préparation

1. Préparez le SSM :
   a. Inversez 10 fois pour mélanger.
   b. Centrifugez brièvement. Le réactif pourrait contenir des particules blanches liées au produit. Aucune action n'est requise. Il n'y a aucun impact sur les performances du produit.

Procédure

1. Retirer la plaque CF PCR du thermocycleur.
2. Ajouter 25 µl de SSM dans chaque puits d'échantillon.
3. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CF PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
4. Agiter à 1 200 tr/min pendant 1 minute.

5. Centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.
6. Placer sur un thermocycleur et exécuter le programme 2ndSS.
   Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.
7. Lorsque les échantillons atteignent 4 °C, les maintenir enfoncés pendant 1 minute, puis passer immédiatement à l'étape suivante.

Nettoyage de l'ADNc

Ce processus utilise du SPB pour purifier l'ADNc des composants de réaction indésirables. Les billes sont lavées deux fois avec de l'EtOH frais à 80 %. L'ADNc est élué avec le RSB.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - SPB : s'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
   - RSB : réservé pour une utilisation dans la procédure.
2. Préparer l'EtOH frais à 80 % dans un tube conique de 15 ml ou 50 ml comme suit.

   Tableau 15 Préparer de l'EtOH frais à 80 %

Réactif	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques
100 % EtOH, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Mélanger l'EtOH frais à 80 % à l'aide d'un vortex.
4. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits BIND1 (Liaison ADNc).
5. Couvrir et mettre de côté.
6. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Retirer la plaque CF PCR du thermocycleur.
2. Mélanger le SPB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension.
3. Ajouter immédiatement 90 µl de SPB dans chaque puits d'échantillon de la plaque BIND1 MIDI.
   Si vous utilisez un compartiment pour distribuer le SPB, inclure un facteur de dépassement de 1,15 lors de l'aliquotage d'une quantité suffisante de matériel par échantillon. Jeter tout matériel restant après l'ajout du SPB dans chaque puits d'échantillon.
4. Transférer la totalité du volume (50 µl) de chaque échantillon de la plaque CF PCR dans le puits correspondant de la plaque BIND1 MIDI.

5. Jeter la plaque CF PCR vide.
6. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BIND1 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
7. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
8. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
9. Placer la plaque BIND1 MIDI sur un support magnétique pendant 5 minutes.
10. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits d'échantillon.

Lavage

1. Laver les billes comme suit.
   a. Conserver la plaque BIND1 MIDI sur le support magnétique et ajouter 200 µl d'EtOH frais à 80 % dans chaque puits.
   b. Patienter 30 secondes.
   c. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits d'échantillon.
2. Laver les billes une **deuxième** fois.
3. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer l'EtOH résiduel de chaque puits.
4. Jeter l'EtOH à 80 % non utilisé.

Éluez

1. Retirer la plaque BIND1 MIDI du support magnétique.
2. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
3. Ajouter 22 µl de RSB à chaque puits d'échantillon.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BIND1 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
5. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
6. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI PCF (fragments d'ADNc purifiés) à 96 puits.
   Si vous vous arrêtez au *POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ* à la page 50 à la page 1, utilisez une plaque PCR.
9. Transférer 20 µl d'éluat de chaque puits de l'échantillon de la plaque BIND1 MIDI dans le puits correspondant de la plaque PCF.
10. Jeter la plaque BIND1 MIDI vide.
11. Ajouter 30 µl de RSB dans chaque puits d'échantillon de la plaque PCF.
12. Pipeter pour mélanger 10 fois.

13. Appliquer un joint adhésif sur la plaque PCF et la conserver au froid.
14. Renvoyer EPH3, FSM, RVT et SSM au stockage.
15. Pour traiter uniquement des échantillons dérivés de l'ARN (ADNc) sans s'arrêter au point d'arrêt de sécurité, passer à la section *Effectuer une réparation, une extension et une ligation* à la page 53.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, centrifuger la plaque PCF PCR à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 7 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

1. Retirer les contrôles ADN du stockage.
2. Retirer le tube de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (réfrigérer) (réf. 20031119)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TEB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Fragmentation de l'ADNg

Fragmentation de l'ADNg

Ce processus fragmente l'ADNg et génère des fragments d'ADNdb avec des débords de 3' ou 5'.

Préparation

1. Suivre les recommandations contenues dans la section *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28 pour quantifier les échantillons.
2. Préparer TEB : Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger.

Procédure

Préparation de la plaque

Sélectionner l'une des options suivantes pour préparer la plaque :

- Traiter les échantillons d'ADNg simultanément avec les échantillons d'ADNc dans la plaque PCF MIDI.
  a. Étiqueter la plaque PCF MIDI LP (Préparation de la bibliothèque).
  b. Garder au froid et mettre de côté pour utilisation dans *Transférer l'ADN fragmenté* à la page 52.
- Traiter les échantillons d'ADNg simultanément avec les échantillons d'ADNc et la plaque PCF PCR est congelée.
  a. Décongeler la plaque PCF PCR à température ambiante.
  b. Centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.

c. Pipeter 10 fois pour mélanger.
d. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits LP (Préparation de la bibliothèque).
e. Transférer la totalité des 50 µl de chaque échantillon de la plaque PCF PCR dans le puits correspondant de la plaque LP MIDI.
f. Jeter la plaque PCF PCR.
g. Appliquer le sceau adhésif de la plaque et garder au froid jusqu'au *Transférer l'ADN fragmenté* à la page 52.

- Traiter uniquement les échantillons d'ADNg.
  a. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits LP (Préparation de la bibliothèque).
  Si vous vous arrêtez au *POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ* à la page 52, utilisez une plaque PCR.
  b. Couvrir et mettre de côté pour utilisation dans *Transférer l'ADN fragmenté* à la page 52.

Diluer l'ADNg

1. Décongeler les échantillons d'ADNg et les contrôles d'ADN à température ambiante.
2. Pipeter chaque échantillon d'ADNg 10 fois pour mélanger.
3. Centrifuger brièvement le tube pour recueillir les gouttelettes.
4. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le TEB.
5. Utiliser le TEB pour préparer chaque échantillon d'ADNg dans un volume final de 52 µl. Consulter le tableau suivant pour connaître les quantités d'entrée et les concentrations minimales en fonction du type d'échantillon.
   - Le test nécessite une concentration d'extraction minimale pour permettre au moins 40 µl de TEB du volume de 52 µl.
   - Pour les contrôles d'ADN, utiliser la concentration indiquée sur l'étiquette du tube.
   - Pour éviter la perte d'échantillon, ne pas pipeter moins de 2 µl d'échantillon dans cette dilution.

Type d'échantillon	Montant d'entrée (ng)	Concentration minimale (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Contrôle	40	Consulter l'étiquette du tube

Fragment

1. Ajouter 52 µl de chaque échantillon d'ADNg dans un puits séparé du tube à ultrasons.

   ⚠ ATTENTION

   Charger lentement l'ADNg dans le tube, en s'assurant qu'il n'y a pas d'espace d'air au fond du tube. Pour plus d'informations, consulter la section *Test* à la page 30 et les instructions du fabricant.

2. Noter l'orientation de la bandelette.
3. Fragmenter l'ADNg à l'aide de l'appareil à ultrasons.

Transférer l'ADN fragmenté

1. S'assurer que la disposition et les index de la plaque d'échantillon pour chaque échantillon correspondent à l'analyse sélectionnée pour l'analyse avec le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU).
2. Suivre les instructions du fabricant de l'appareil à ultrasons pour récupérer l'échantillon.
   Pour certains types de tubes à ultrasons, une centrifugation est nécessaire pour consolider l'échantillon dans le tube.
3. Pour chaque échantillon d'ADNg fragmenté, utiliser une pipette à embouts fins pour effectuer trois transferts de 16,7 µl dans un puits vide de la plaque LP MIDI.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP MIDI.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, appliquer un joint adhésif sur la plaque de LP PCR et centrifuger à 280 × g pendant 1 minute. À conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 7 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

S'assurer que les programmes du thermocycleur post-amplification sont définis. Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.

1. Préparer un seau à glace ou équivalent.
2. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (congélation) (réf. 20031118)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
ERA1-A	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Effectuer une réparation, une extension et une ligation
ERA1-B	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Effectuer une réparation, une extension et une ligation
ALB1	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
LIG3	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Ligation des adaptateurs
SUA1 (bouchon bleu)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
UMI (bouchon blanc)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
STL	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Ligation des adaptateurs
EPM	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Indexation PCR

Tableau 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (réfrigérer) (réf. 20031119)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SPB (étiquette vert clair)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Nettoyage de la ligation
RSB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Nettoyage de la ligation

Tableau 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (réf. 20031120)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
UPxx	-25 °C à -15 °C	Décongeler les tubes de primer d'indexation appropriés à température ambiante.	Indexation PCR

Tableau 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (réf. 20031126)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
CPxx	-25 °C à -15 °C	Décongeler les tubes de primer d'indexation appropriés à température ambiante.	Indexation PCR

Effectuer une réparation, une extension et une ligation

Ce processus répare les surplombs résultant de la fragmentation en extrémités avec des queues en A en surplomb à l'aide d' un mélange maître d'end repair A-tailing (ERA1).

L'activité exonucléase de 3' à 5' de ce mélange élimine les surplombs de 3' et l'activité polymérase de 5' à 3' remplit les surplombs de 5'. Les extrémités de 3' subissent une polyadénylation pendant cette réaction pour les empêcher de se ligaturer les unes les autres pendant la réaction de ligature de l'adaptateur.

Préparation

1. Préchauffer 2 incubateurs à micro-échantillons avec inserts de bloc thermique MIDI comme suit.
   - Préchauffer un incubateur de micro-échantillons à 30 °C.
   - Préchauffer un incubateur de micro-échantillons à 72 °C.
2. Préparer les réactifs suivants.
   - ERA1-A : Centrifuger brièvement, puis pipeter pour mélanger. Garder au froid.
   - ERA1-B : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
     Vérifier la présence de précipités. Le cas échéant, réchauffer le tube à 37 °C, puis pipeter pour mélanger jusqu'à dissolution des précipités.
3. Préparer le mélange maître ERA1 dans un tube de microcentrifugeuse.

   Tableau 21 Mélange maître ERA1*

Composant du mélange maître	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
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

   * Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section *Manipulation des réactifs* à la page 34 pour les calculs.
4. Pipeter lentement 10 fois pour garantir l'homogénéité, puis centrifuger brièvement. Garder le mélange maître ERA1 au froid.
5. Pour préparer la plaque, sélectionner l'une des options suivantes :
   - Si les échantillons sont dans une plaque MIDI, la préparer comme suit.
     a. Réétiqueter la plaque MIDI LP2 (Préparation de la bibliothèque 2).
     b. Si certains échantillons se trouvent dans des plaques MIDI séparées, déplacer tous les échantillons vers des puits séparés de la même plaque MIDI selon la disposition de la plaque.
   - Si la plaque est congelée, la préparer comme suit.
     a. Décongeler la plaque PCF PCR ou la plaque LP PCR à température ambiante.
     b. Centrifuger la plaque à 280 × g pendant 1 minute.
     c. Pipeter 10 fois pour mélanger.
     d. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits LP2 (Préparation de la bibliothèque 2).
     e. Transférer la totalité des 50 µl de chaque échantillon de la plaque PCF PCR ou de la plaque LP PCR dans le puits correspondant de la plaque LP2 MIDI.
     f. Jeter la plaque PCF PCR ou LP PCR.

Procédure

1. Ajouter 10 µl de mélange maître ERA1 dans chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI.

2. Jeter le mélange maître ERA1 restant.
3. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
4. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
5. Incuber dans l'incubateur de micro-échantillons préchauffé à 30 °C pendant 30 minutes.
6. Transférer immédiatement dans un deuxième incubateur à micro-échantillons préchauffé.
7. Incuber à 72 °C pendant 20 minutes.
8. Garder la plaque LP2 MIDI au froid pendant 5 minutes.

Ligation des adaptateurs

Ce processus ligature les adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADNc et/ou d'ADNg.

Le TSO Comprehensive (EU) test comprend des adaptateurs SUA1 et UMI.

- Utiliser des adaptateurs SUA1 avec des échantillons d'ARN.
- Utiliser des adaptateurs UMI avec des échantillons d'ADN.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - ALB1 : Mélanger à l'aide d'un vortex pendant au moins 10 secondes, puis centrifuger brièvement.
   - LIG3 : Centrifuger brièvement, puis pipeter pour mélanger. Garder au froid.
   - SUA1 : Mélanger à l'aide d'un vortex pendant au moins 10 secondes, puis centrifuger brièvement.
   - UMI : Mélanger à l'aide d'un vortex pendant au moins 10 secondes, puis centrifuger brièvement.
   - STL : Mettre de côté pour une utilisation dans la procédure.

Procédure

1. Retirer la plaque LP2 MIDI de la glace ou équivalent.
2. Ajouter 60 µl d'ALB1 dans chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI. ALB1 est une solution visqueuse. Pipeter lentement pour minimiser la formation de bulles.
3. Ajouter 5 µl de LIG3 dans chaque puits d'échantillon.
4. Ajouter des adaptateurs comme suit.
   Ne *pas* combiner différents types d'adaptateurs.
   - **[Puits d'échantillon d'ARN]**—Ajouter 10 µl de SUA1 (bouchon bleu) pour chaque échantillon dérivé de l'ARN.
   - **[Puits d'échantillon d'ADN]**—Ajouter 10 µl d'UMI (bouchon blanc) pour chaque échantillon dérivé de l'ADN.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.

Sceller complètement les bords et les puits.

6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes.
8. Mélanger STL à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
9. Ajouter 5 µl de STL dans chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI.
10. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
    Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
11. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.

Nettoyage de la ligation

Ce processus utilise du SPB pour purifier les fragments d'ADNc ou d'ADNg ligaturés par adaptateur et élimine les produits indésirables. Les billes sont lavées deux fois avec de l'éthanol frais à 80 %. Les échantillons ligaturés par adaptateur sont élués avec du RSB.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - SPB : s'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
   - RSB : réservé pour une utilisation dans la procédure.
2. Préparer l'EtOH frais à 80 % dans un tube conique de 15 ml ou 50 ml.

   Tableau 22 Préparer de l'éthanol frais à 80 %

Réactif	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
100 % EtOH, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Mélanger l'EtOH frais à 80 % à l'aide d'un vortex.
4. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Mélanger le SPB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension.
2. Ajouter immédiatement 112 µl de SPB dans chaque puits d'échantillon de la plaque LP2 MIDI.
   Si vous utilisez un compartiment pour distribuer le SPB, inclure un facteur de dépassement de 1,15 lors de l'aliquotage d'une quantité suffisante de matériel par échantillon. Jeter tout matériel restant après l'ajout du SPB dans chaque puits d'échantillon.

3. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
4. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
5. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
6. Placer la plaque LP2 MIDI sur le support magnétique pendant 10 minutes.
7. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits d'échantillon.

Lavage

1. Laver les billes comme suit.
   a. Conserver la plaque LP2 MIDI sur le support magnétique et ajouter 200 µl d'EtOH frais à 80 % dans chaque puits d'échantillon.
   b. Patienter 30 secondes.
   c. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits d'échantillon.
2. Laver les billes une **deuxième** fois.
3. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer l'EtOH résiduel de chaque puits.
4. Jeter l'EtOH à 80 % non utilisé.

Éluez

1. Retirer la plaque LP2 MIDI du support magnétique.
2. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
3. Ajouter 27,5 µl de RSB à chaque puits d'échantillon.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LP2 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
5. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
6. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
7. Placer la plaque LP2 MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque de PCR à 96 puits LS (échantillons de la bibliothèque).
9. Transférer 25 µl de chaque éluat de la plaque LP2 MIDI dans le puits correspondant de la plaque LS PCR.
10. Jeter la plaque LP2 MIDI vide.

Indexation PCR

Dans cette étape, les fragments de bibliothèque sont amplifiés à l'aide de primers qui ajoutent des séquences d'index pour le multiplexage des échantillons. Le produit obtenu contient la bibliothèque complète de fragments d'ADNc et/ou d'ADN, encadrés par les adaptateurs requis pour la génération de clusters.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - EPM : Garder au froid.
   - UPxx : Mélanger à l'aide d'un vortex et centrifuger brièvement. UPxx est le primer d'indexation sélectionné sur l'écran Create Run (Créer une analyse) dans le Local Run Manager logiciel pendant la configuration de l'analyse.
   - CPxx : Mélanger à l'aide d'un vortex et centrifuger brièvement. CPxx est le primer d'indexation sélectionné sur l'écran Create Run (Créer une analyse) dans le logiciel Local Run Manager pendant la configuration de l'analyse.
2. S'assurer que les index de chaque échantillon correspondent à l'analyse prévue sur le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU) pendant la configuration de l'analyse. S'assurer de suivre les instructions concernant la sélection de l'index dans la section *Nombre de bibliothèques et sélection des index* à la page 36.

   ⚠ ATTENTION

   Les mauvaises correspondances entre les échantillons et les primers d'indexation entraînent des résultats erronés en raison de la perte de l'identification positive de l'échantillon.

Procédure

1. Ajouter 5 µl du primer d'indexation approprié (UPxx ou CPxx) au puits d'échantillon correspondant dans la plaque de LS PCR en fonction des index sélectionnés.

   ⚠ ATTENTION

   Manipuler et ouvrir un seul tube de primer d'indexation à la fois. Reboucher chaque tube index avec un nouveau bouchon immédiatement après utilisation. Ne pas combiner les primers d'indexation.
2. Mélanger l'EPM à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes, puis centrifuger brièvement.
3. Ajouter 20 µl d'EPM dans chaque puits d'échantillon.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque LS PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
5. Agiter à 1 200 tr/min pendant 1 minute.
6. Remettre les réactifs de pré-amplification en stockage.

   ⚠ ATTENTION

   Effectuer toutes les étapes suivantes dans une zone post-amplification pour éviter le transfert du produit d'amplification.
7. Centrifuger la plaque LS PCR à 280 × g pendant 1 minute.
8. Placer sur le thermocycleur post-amplification préprogrammé et exécuter le programme I-PCR.

Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.

Si vous poursuivez la *Configuration de la première hybridation* à la page 60, suivez les instructions de décongélation pour les réactifs dans les Étapes de préparation du protocole.

9. Une fois le programme I-PCR terminé, centrifuger la plaque LS PCR à 280 × g pendant 1 minute.
10. Réétiqueter la plaque d'échantillons de bibliothèque amplifiée, ALS (Échantillons de bibliothèques amplifiées).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, conserver la plaque ALS PCR entre -25 °C et -15 °C pendant 30 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant à l'hybridation de nuit.

1. S'assurer que les programmes du thermocycleur post-amplification sont définis. Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.
2. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigérer) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TCB1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Tableau 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (congélation) (réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
TCA1	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Tableau 25 TruSight Oncology Comp Content Set Box (réf. 20031122)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
OPR1 (bouchon rouge)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation
OPD2 (bouchon blanc)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la première hybridation

Configuration de la première hybridation

Au cours de ce processus, un groupe d'oligonucléotides s'hybride aux bibliothèques d'ADNc, et un groupe d'oligonucléotides s'hybride aux bibliothèques d'ADNg préparées dans la section *Indexation PCR* à la page 57. L'enrichissement des régions ciblées nécessite deux étapes d'hybridation. Lors de la première hybridation, les oligonucléotides s'hybrident aux bibliothèques d'ADNc et/ou d'ADNg pendant la nuit (8 heures à 24 heures).

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - TCB1 : Chauffer le tube à 37 °C pendant 5 minutes. Mélanger à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes, puis centrifuger brièvement.

- TCA1 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
- OPR1 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
- OPD2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.

2. Si la plaque ALS PCR a été conservée, décongeler à température ambiante et centrifuger à 280 × g pendant 1 minute. Pipeter pour mélanger.
3. Étiqueter une nouvelle plaque PCR 96 puits HYB1 (Hybridation 1).

Procédure

1. Transférer 20 µl de chaque bibliothèque d'ADNc et/ou d'ADNg de la plaque ALS PCR dans le puits correspondant de la plaque HYB1 PCR.
2. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ALS PCR et la mettre de côté.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
3. Inspecter le TCB1 à la recherche de précipités. Le cas échéant, réchauffer le tube et le mélanger à l'aide d'un vortex jusqu'à ce que les cristaux se dissolvent.
4. Ajouter 15 µl de TCB1 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque HYB1 PCR.
5. Ajouter 10 µl de TCA1 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque HYB1 PCR.
6. Ajouter des sondes.
   Ne ***pas*** combiner différents types de sondes. Ajouter un seul jeu de sondes par puits.
   - **[Puits de bibliothèque d'ARN]**—Ajouter 5 µl d'OPR1 (bouchon rouge) pour chaque bibliothèque dérivée de l'ARN.
   - **[Puits de bibliothèque d'ADN]** —Ajouter 5 µl d'OPD2 (bouchon blanc) pour chaque bibliothèque dérivée de l'ADN.
7. Appliquer un joint adhésif sur la plaque HYB1 PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
8. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
9. Placer sur le thermocycleur et exécuter le programme HYB1.
   Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.
10. Hybrider à 57 °C pendant un minimum de 8 heures à un maximum de 24 heures.
11. Remettre les réactifs d'hybridation en stockage.
12. Conserver la plaque ALS PCR entre -25 °C et -15 °C pendant 30 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

Au début du Jour 2, retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigérer) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SMB (étiquette bleu foncé)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Capture des cibles un Capture des cibles deux
ET2	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Capture des cibles un Capture des cibles deux
HP3	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Capture des cibles un Capture des cibles deux Normalisation des bibliothèques
TCB1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation
RSB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Capture des cibles deux Nettoyage de la bibliothèque enrichie amplifiée

Tableau 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (congélation) (réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
EE2	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Capture des cibles un Capture des cibles deux Normalisation des bibliothèques
EEW	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Capture des cibles un
TCA1	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation

Tableau 28 TruSight Oncology Comp Content Set Box (réf. 20031122)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
OPR1 (bouchon rouge)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation
OPD2 (bouchon blanc)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Configuration de la deuxième hybridation

Capture des cibles un

Cette étape utilise du SMB pour capturer des sondes hybridées aux régions d'intérêt ciblées. Les billes sont lavées trois fois avec EEW. Les bibliothèques enrichies sont éluées à l'aide d'un mélange d'élution EE2 + HP3 frais et neutralisées avec de l'ET2.

Préparation

1. Préchauffer un incubateur de micro-échantillons avec un bloc chauffant MIDI à 57 °C.
2. Préparer les réactifs suivants.
   - EEW : Mélanger à l'aide d'un vortex pendant 1 minute.
   - EE2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
   - HP3 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
   - SMB : S'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
     S'assurer d'utiliser **SMB**, et non SPB, pour cette procédure.
   - ET2 : Réserver pour une utilisation dans la procédure.
3. Préparer le mélange d'élution EE2 + HP3 frais dans un tube de microcentrifugeuse.

   Tableau 29 Mélange d'élution EE2 + HP3 pour la capture des cibles un*

Composant de mélange d'élution	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

   * Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section *Manipulation des réactifs* à la page 34 pour les calculs.
4. Mélanger le mélange d'élution EE2 + HP3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement. Mettre de côté pour l'étape *Éluez* à la page 64.
5. Étiqueter une nouvelle plaque CAP1 MIDI à 96 puits (Capture 1).
6. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Retirer la plaque HYB1 PCR du thermocycleur.
2. Centrifuger la plaque HYB1 PCR à 280 × g pendant 1 minute.
3. Mélanger le SMB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension.
   En présence de précipité ou de culot de billes, veiller à atteindre la température ambiante, pipeter de haut en bas pour libérer le culot, puis mélanger à l'aide d'un vortex pour remettre en suspension.
4. Ajouter immédiatement 150 µl de SMB à chaque puits de bibliothèque de la plaque CAP1 MIDI.
   Si vous utilisez un compartiment pour distribuer le SMB, incluez un facteur d'excédent de 1,15 lors de l'aliquotage afin d'avoir une quantité suffisante de matériel par échantillon.
5. Jetez tout matériel restant après avoir ajouté SMB à chaque puits d'échantillon.
6. Régler la pipette sur 50 µl et transférer le volume entier de chaque bibliothèque de la plaque HYB1 PCR dans le puits correspondant de la plaque CAP1 MIDI.

7. Jetez la plaque HYB1 PCR vide.
8. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP1 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
9. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
10. Incuber dans l'incubateur à micro-échantillons préchauffé à 57 °C pendant 25 minutes.
11. Placer la plaque CAP1 MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
12. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.

⚠ ATTENTION

Passer immédiatement à l'étape suivante (*Lavage* à la page 64). Ne pas laisser reposer le culot de billes pendant une durée prolongée sans liquide.

Lavage

1. Laver les billes comme suit.
   a. Retirer la plaque CAP1 MIDI du support magnétique.
   b. Ajouter 200 µl d'EEW dans chaque puits.
   c. Utiliser une pipette réglée sur 150 µl et pipeter au moins 10 fois pour mélanger. S'assurer que toutes les billes sont remises en suspension.
      S'assurer qu'aucune pastille de billes n'est présente en aspirant soigneusement la solution de billes totales du puits dans l'embout. Inspecter visuellement le fond de chaque puits. Si un culot de billes est présent, incliner l'embout de la pipette vers le culot pendant les étapes de lavage pour le déloger. S'assurer que le culot de billes est complètement immergé dans la solution. La solution doit avoir un aspect marron foncé et avoir une consistance homogène.
   d. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP1 MIDI.
   e. Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
   f. Agiter à 1 800 tr/min pendant 4 minutes.
   g. Incuber dans un incubateur de micro-échantillons à 57 °C pendant 5 minutes.
   h. Placer la plaque CAP1 MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
   i. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.
2. Laver les billes une **deuxième** fois.
3. Laver les billes une **troisième** fois.
4. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer l'EEW résiduel de chaque puits.

Éluez

1. Retirer la plaque CAP1 MIDI du support magnétique.

2. Mélanger le mélange d'élution EE2 + HP3 frais à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
3. Ajouter avec précaution 17 µl de mélange d'élution EE2 + HP3 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque CAP1 MIDI.
4. Jeter le mélange d'élution EE2 + HP3 restant.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP1 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque de PCR à 96 puits ELU1 (Elution 1).
9. Mélanger l'ET2 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
10. Ajouter 5 µl d'ET2 à chaque puits de bibliothèque correspondant dans la nouvelle plaque ELU1 PCR.
11. Transférer avec précaution 15 µl d'éluat de chaque puits de bibliothèque de la plaque CAP1 MIDI dans le puits correspondant de la plaque ELU1 PCR.
12. Jeter la plaque CAP1 MIDI vide.
13. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ELU1 PCR.
    Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
14. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
15. Remettre les EEW au stockage.

Configuration de la deuxième hybridation

Cette étape lie les régions ciblées des bibliothèques d'ADNc et/ou d'ADNg enrichies avec des sondes de capture une deuxième fois. La deuxième hybridation garantit une spécificité élevée des régions capturées. Pour assurer un enrichissement optimal des bibliothèques, effectuer la deuxième étape d'hybridation à 57 °C pendant un minimum de 1,5 heure à un maximum de 4 heures.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - TCB1 : Chauffer le tube à 37 °C pendant 5 minutes. Mélanger à l'aide d'un vortex pendant 10 secondes, puis centrifuger brièvement.
   - TCA1 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
   - OPR1 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
   - OPD2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.

Procédure

1. Inspecter le TCB1 à la recherche de précipités. Le cas échéant, réchauffez le tube et mélanger à l'aide d'un vortex jusqu'à ce que les cristaux se dissolvent.

2. Ajouter 15 µl de TCB1 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque ELU1 PCR.
3. Ajouter 10 µl de TCA1 à chaque puits de la bibliothèque.
4. Ajouter à chaque puits la même sonde utilisée lors de la première hybridation. Ajouter un seul jeu de sondes par puits.
   Ne ***pas*** combiner différents types de sondes.
   - **[Puits de bibliothèque d'ARN]**—Ajouter 5 µl d'OPR1 (bouchon rouge) pour chaque bibliothèque dérivée de l'ARN.
   - **[Puits de bibliothèque d'ADN]**—Ajouter 5 µl d'OPD2 (bouchon blanc) pour chaque bibliothèque dérivée de l'ADN.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ELU1 PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
6. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un thermocycleur et exécuter le programme HYB2.
   Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.
8. Hybrider à 57 °C pendant un minimum de 1,5 heure à un maximum de 4 heures.
9. Remettre les réactifs d'hybridation en stockage.

Capture des cibles deux

Cette étape utilise du SMB pour capturer des sondes hybridées aux régions d'intérêt ciblées. Les billes sont lavées une fois avec du RSB. Les bibliothèques enrichies sont éluées à l'aide d'un mélange d'élution EE2 + HP3 frais et neutralisées avec de l'ET2.

Préparation

1. Préchauffer un incubateur de micro-échantillons avec un bloc chauffant MIDI à 57 °C.
2. Préparer les réactifs suivants.
   - EE2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
   - HP3 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
   - SMB : S'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
     S'assurer d'utiliser **SMB**, et non SPB, pour cette procédure.
   - RSB : réservé pour une utilisation dans la procédure.
   - ET2 : Réserver pour une utilisation dans la procédure.
3. Préparer le mélange d'élution EE2 + HP3 frais dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 30 Mélange d'élution EE2 + HP3 pour la capture des cibles deux*

Composant de mélange d'élution	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section *Manipulation des réactifs* à la page 34 pour les calculs.

4. Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement. Mettre de côté pour l'étape *Éluez* à la page 68.
5. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI CAP2 à 96 puits (capture 2).
6. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Retirer la plaque ELU1 PCR du thermocycleur.
2. Centrifuger la plaque ELU1 PCR à 280 × g pendant 1 minute.
3. Mélanger le SMB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension.
   En présence de précipité ou de culot de billes, veiller à atteindre la température ambiante, pipeter de haut en bas pour libérer le culot, puis mélanger à l'aide d'un vortex pour remettre en suspension.
4. Ajouter immédiatement 150 µl de SMB à chaque puits de la bibliothèque de la plaque CAP2 MIDI.
   Si vous utilisez un compartiment pour distribuer le SMB, incluez un facteur d'excédent de 1,15 lors de l'aliquotage afin d'avoir une quantité suffisante de matériel par échantillon.
5. Jetez tout matériel restant après avoir ajouté SMB à chaque puits d'échantillon.
6. Régler la pipette sur 50 µl et transférer le volume entier de chaque bibliothèque de la plaque ELU1 PCR dans le puits correspondant de la plaque CAP2 MIDI.
7. Jeter la plaque ELU1 PCR vide.
8. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP2 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
9. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
10. Incuber dans un incubateur de micro-échantillons à 57 °C pendant 25 minutes.
    Pour continuer avec la section *Amplification de la bibliothèque enrichie* à la page 70, suivre les instructions de décongélation pour les réactifs dans la section Préparation au protocole.
11. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
12. Laisser la plaque CAP2 MIDI sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

⚠ ATTENTION

Passer immédiatement à l'étape suivante (*Lavage* à la page 68). Ne pas laisser reposer le culot de billes pendant une durée prolongée sans liquide.

Lavage

1. Retirer la plaque CAP2 MIDI du support magnétique.
2. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
3. Ajouter 200 µl de RSB à chaque puits.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP2 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
5. Agiter à 1 800 tr/min pendant 4 minutes.
6. Placer la plaque sur le support magnétique pendant 2 minutes.
7. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.
8. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer le RSB résiduel de chaque puits.

Éluez

1. Retirer la plaque CAP2 MIDI du support magnétique.
2. Mélanger le mélange d'élution EE2 + HP3 frais à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
3. Ajouter 22 µl de mélange d'élution EE2 + HP3 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque CAP2 MIDI.
4. Jeter le mélange d'élution EE2 + HP3 restant.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque CAP2 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque de PCR à 96 puits ELU2 (Elution 2).
9. Mélanger l'ET2 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
10. Ajouter 5 µl d'ET2 à chaque puits de bibliothèque correspondant dans la nouvelle plaque ELU2 PCR.
11. Transférer avec précaution 20 µl d'éluat de chaque puits de bibliothèque de la plaque CAP2 MIDI dans le puits correspondant de la plaque ELU2 PCR.
12. Jeter la plaque CAP2 MIDI vide.
13. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ELU2 PCR.
    Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
14. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
15. Remettre SMB, EE2, HP3, RSB et ET2 en stockage.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, centrifuger la plaque ELU2 PCR à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 7 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

1. Préparer un seau à glace ou équivalent.
2. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (congélation) (réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
PPC3	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Amplifier la bibliothèque enrichie
EPM	-25 °C à -15 °C	Garder au froid.	Amplifier la bibliothèque enrichie

Tableau 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigérer) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
SPB (étiquette vert clair)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Nettoyage de la bibliothèque enrichie amplifiée
RSB	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Nettoyage de la bibliothèque enrichie amplifiée Préparation au séquençage

Amplification de la bibliothèque enrichie

Cette étape utilise des primers pour amplifier les bibliothèques enrichies.

Préparation

1. Si la plaque ELU2 a été conservée, décongeler à température ambiante, puis centrifuger à 280 × g pendant 1 minute.

Procédure

1. Mélanger le PPC3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
2. Ajouter 5 µl de PPC3 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque ELU2 PCR.
3. Mélanger l'EPM à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes, puis centrifuger brièvement.
4. Ajouter 20 µl d'EPM à chaque puits de la bibliothèque.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque ELU2 PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
6. Agiter à 1 200 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un thermocycleur et exécuter le programme EL-PCR.
   Consulter *Programmation des thermocycleurs* à la page 43.
   Si vous poursuivez avec *Normalisation des bibliothèques* à la page 73, suivez les instructions de décongélation de la section Préparation au protocole.
8. Remettre le PPC3 et l'EPM en stockage.

Nettoyage de la bibliothèque enrichie amplifiée

Cette étape utilise du SPB pour purifier les bibliothèques enrichies des composants de réaction indésirables. Les billes sont lavées deux fois avec de l'éthanol frais à 80 %. Les bibliothèques sont éluées avec du RSB.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - SPB : s'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes. S'assurer d'utiliser **SPB**, et non SMB pour cette procédure.
   - RSB : réservé pour une utilisation dans la procédure.
2. Préparer de l'éthanol frais à 80 % dans un tube conique de 15 ml ou 50 ml.

Tableau 33 Préparer de l'éthanol frais à 80 %

Réactif	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
100 % EtOH, pur	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Mélanger l'EtOH frais à 80 % à l'aide d'un vortex.
4. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits BIND2 (Nettoyer la liaison).
5. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Retirer la plaque ELU2 PCR du thermocycleur.
2. Centrifuger la plaque ELU2 PCR à 280 × g pendant 1 minute.
3. Mélanger le SPB à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension.
4. Ajouter immédiatement 110 µl de SPB dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque BIND2 MIDI.
5. Transférer 50 µl de chaque bibliothèque de la plaque ELU2 PCR dans le puits correspondant de la plaque BIND2 MIDI.
6. Jeter la plaque ELU2 PCR vide.
7. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BIND2 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
8. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
9. Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
10. Placer la plaque BIND2 MIDI sur un support magnétique pendant 5 minutes.
11. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.

Lavage

1. Laver les billes comme suit.
   a. Conserver la plaque BIND2 MIDI sur le support magnétique et ajouter 200 µl d'EtOH frais à 80 % dans chaque puits.
   b. Patienter 30 secondes.
   c. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.
2. Laver les billes une **deuxième** fois.
3. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer l'EtOH résiduel de chaque puits.

4. Jeter l'EtOH à 80 % non utilisé.

Éluez

1. Retirer la plaque BIND2 MIDI du support magnétique.
2. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
3. Ajouter 32 µl de RSB à chaque puits de la bibliothèque.
4. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BIND2 MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
5. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
6. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque PCR à 96 puits PL (bibliothèques purifiées).
9. Transférer 30 µl de chaque éluat de la plaque BIND2 MIDI dans le puits correspondant de la plaque PL PCR.
10. Jeter la plaque BIND2 MIDI vide.
11. Appliquer un joint adhésif sur la plaque PL PCR.
12. Remettre le SPB et le RSB en stockage.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, centrifuger la plaque PL PCR à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 30 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au prochain point d'arrêt sûr.

1. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (congélation) (réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
LNA1	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques
EE2	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques

Tableau 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigérer) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
LNB1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante pendant 30 minutes.	Normalisation des bibliothèques
HP3	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques Préparation au séquençage
LNW1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques
LNS1	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Normalisation des bibliothèques

2. Pour poursuivre le même jour avec la *Préparation au séquençage* à la page 77, suivre les instructions de décongélation dans la section Préparation au protocole.

Normalisation des bibliothèques

Ce processus utilise du LNB1 plus des additifs (LNA1) pour normaliser la quantité de chaque bibliothèque afin de garantir une représentation uniforme de la bibliothèque dans les bibliothèques regroupées. Les billes sont lavées deux fois avec du LNW1. Les bibliothèques sont éluées avec un mélange d'élution EE2 + HP3 frais et neutralisées avec du LNS1.

Préparation

1. Préparer les réactifs suivants.
   - LNB1 : S'assurer que les billes sont à température ambiante pendant 30 minutes.
   - LNA1 : Mélanger à l'aide d'un vortex.
   - EE2 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
   - HP3 : Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
   - LNW1 : Mélanger à l'aide d'un vortex. Mettre de côté pour une utilisation dans la procédure.
   - LNS1 : Mélanger à l'aide d'un vortex. Mettre de côté pour une utilisation dans la procédure.
2. Mélanger le LNB1 à l'aide d'un vortex pendant 1 minute pour remettre les billes en suspension. Retourner le tube de LNB1 pour s'assurer que toutes les billes sont remises en suspension.
3. Utiliser une pipette réglée à 800 µl pour pipeter 10 fois le LNB1 vers le haut et vers le bas pour assurer la resuspension.
4. Préparer immédiatement le mélange maître LNA1 + LNB1 frais dans un tube conique.

⚠ ATTENTION

Remettre complètement en suspension le culot de billes de LNB1 au fond du tube pour éviter une densité de grappes incohérente.

Tableau 36 Mélange maître LNA1 + LNB1*

Composant du mélange maître	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
LNA1	305 µl	610 µl	1 219 µl	1 829 µl	3 658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section *Manipulation des réactifs* à la page 34 pour les calculs.

5. Mélanger le mélange principal LNA1+LNB1 à l'aide d'un vortex. Mettre de côté pour l'étape *Liaison* à la page 74.
6. Préparer le mélange d'élution EE2 + HP3 frais dans un tube de microcentrifugeuse.

Tableau 37 Mélange d'élution EE2 + HP3 pour la normalisation des bibliothèques*

Composant de mélange d'élution	4 bibliothèques	8 bibliothèques	16 bibliothèques	24 bibliothèques	48 bibliothèques
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1 824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Ce tableau comprend le dépassement de volume. Consulter la section *Manipulation des réactifs* à la page 34 pour les calculs.

7. Mélanger le mélange d'élution frais à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement. Mettre de côté pour l'étape *Éluez* à la page 75.
8. Si la plaque PL PCR a été conservée, décongeler à température ambiante, centrifuger à 280 × g pendant 1 minute. Pipeter pour mélanger.
9. Étiqueter une nouvelle plaque MIDI 96 puits de BBN (normalisation par billes).
10. Installer l'aimant.

Procédure

Liaison

1. Mélanger le mélange principal LNA1+LNB1 à l'aide d'un vortex.
2. Ajouter immédiatement 45 µl de mélange maître LNA1 + LNB1 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque BBN MIDI.
3. Éliminer le mélange maître LNA1 + LNB1 restant.
4. Ajouter 20 µl de chaque bibliothèque de la plaque PL PCR dans le puits correspondant de la plaque BBN MIDI.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BBN MIDI.

Sceller complètement les bords et les puits.

6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 30 minutes.
7. Appliquer le joint de la plaque adhésive sur la plaque PL PCR et la remettre en stockage.
8. Placer la plaque BBN MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
9. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.

Lavage

1. Laver les billes comme suit.
   a. Retirer la plaque BBN MIDI du support magnétique.
   b. Ajouter 45 µl de LNW1 à chaque puits de la bibliothèque.
   c. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BBN MIDI.
      Sceller complètement les bords et les puits.
   d. Agiter à 1 800 tr/min pendant 5 minutes.
   e. Placer la plaque BBN MIDI sur un support magnétique pendant 2 minutes.
   f. Laisser la plaque sur le support magnétique. Sans perturber le culot de billes, utiliser une pipette réglée sur 200 µl pour retirer et éliminer tout surnageant de chaque puits.
2. Laver les billes une ***deuxième*** fois.
3. Utiliser une pipette à embouts fins pour éliminer le surnageant résiduel de chaque puits.

Éluez

1. Retirer la plaque BBN MIDI du support magnétique.
2. Mélanger le mélange d'élution EE2 + HP3 frais à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
3. Ajouter 32 µl de solution EE2 + HP3 dans chaque puits de la bibliothèque de la plaque BBN MIDI.
4. Jeter le mélange d'élution restant.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque BBN MIDI.
   Sceller complètement les bords et les puits.
6. Agiter à 1 800 tr/min pendant 2 minutes.
7. Placer sur un support magnétique pendant 2 minutes.
8. Étiqueter une nouvelle plaque PCR 96 puits NL (bibliothèques normalisées).
9. Transférer avec précaution 30 µl d'éluat de chaque puits de bibliothèque de la plaque BBN MIDI dans le puits correspondant de la plaque NL PCR.

⚠ ATTENTION

Si des billes sont aspirées dans les embouts de pipette, les remettre sur la plaque du support magnétique et attendre que le liquide soit clair (~2 minutes) avant de passer à l'étape suivante de la procédure.

10. Jeter la plaque BBN MIDI vide.
11. Mélanger le LNS1 à l'aide d'un vortex.
12. Ajouter 30 µl de LNS1 à chaque puits de la bibliothèque dans la nouvelle plaque NL PCR.
13. Pipeter pour mélanger cinq fois.
14. Appliquer un joint adhésif sur la plaque NL PCR.
    Sceller complètement les bords et les puits.
15. Remettre LNB1, LNA1, EE2, LNW1 et LNS1 en stockage.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Pour arrêter, centrifuger la plaque NL PCR à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 32 jours maximum.

Préparation au protocole

Cette préparation est nécessaire pour effectuer les étapes du protocole menant au séquençage.

Commencer la préparation des consommables de séquençage de la trousse de réactifs NextSeq 550Dx à haut débit v2.5 (300 cycles) (réf. 20028871) au moins une heure avant utilisation.

1. Retirer le tampon de dilution de la bibliothèque (HT1) du stockage entre -25 °C et -15 °C. Décongeler à température ambiante. Après décongélation, garder au froid.
2. Suivre les instructions de préparation du *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)* pour les autres consommables de la trousse.
   - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
   - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
   - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
3. Retirer les tubes de réactif de la boîte et suivre les instructions de décongélation.

Tableau 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (congélation) (réf. 20031121)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
PhiX internal control (PX3 ou PhiX)	-25 °C à -15 °C	Décongeler à température ambiante. Après décongélation, garder au froid.	Préparation au séquençage

Tableau 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (réfrigérer) (réf. 20031123)

Réactif	Stockage	Instructions de décongélation	Étape du protocole
HP3	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Préparation au séquençage
RSB (étiquette rose)	2 °C à 8 °C	Amener à température ambiante.	Préparation au séquençage

Préparation au séquençage

Chaque série de séquençage de l'ADN et de l'ARN doit inclure un contrôle positif et un NTC. Les NTC pour l'ADN et l'ARN sont chacun séquencés de manière répétée selon les besoins afin que chaque série contienne un NTC. Chaque analyse d'ADN et d'ARN comprend un contrôle positif distinct.

Préparation

1. Consulter les directives pour le *Nombre de bibliothèques et sélection des index* à la page 36.

2. Étiqueter un tube de microcentrifugation dHP3 (HP3 dilué).
3. Étiqueter un tube de microcentrifugation dPhiX (PhiX dilué).
4. Préchauffer un bloc chauffant à 96 °C pour les tubes de microcentrifugeuse.
5. Préparer un seau à glace ou équivalent.

Contrôle de dilution et de dénaturation PhiX

1. Mélanger le HP3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
2. Combiner les volumes suivants dans le tube de microcentrifugation dHP3.
   - 10 µl de HP3
   - 190 µl d'eau exempte de RNase/DNase
3. Mélanger le dHP3 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
4. Retourner ou utiliser un vortex pour mélanger le RSB.
5. Mélanger le contrôle PhiX à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
6. Combiner les volumes suivants dans le tube de microcentrifugation dPhiX.
   - 8 µl de RSB
   - 2 µl de contrôle PhiX
7. Ajouter 10 µl de dHP3 au tube dPhiX.
8. Jeter le tube dHP3.
9. Mélanger le tube dPhiX à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
10. Incuber le dPhiX à température ambiante pendant 5 minutes pour dénaturer.
11. Mélanger HT1 à l'aide d'un vortex.
12. Ajouter immédiatement 980 µl de HT1 préréfrigéré au dPhiX.
13. Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
14. Garder PhiX au froid jusqu'à utilisation dans la préparation de la deuxième dilution.
    La concentration finale est de 20 pM dPhiX.
15. Remettre PhiX, HP3 et RSB en stockage.

Groupement et dénaturation des bibliothèques pour TSO Comprehensive (EU)

1. Si la plaque NL PCR a été conservée, décongeler à température ambiante, puis centrifuger la plaque à 280 × g pendant 1 minute.
2. À l'aide d'une pipette multicanaux fixée à 30 µl, pipeter délicatement les bibliothèques dans la plaque NL PCR cinq fois.
   Utiliser de nouveaux conseils pour chaque bibliothèque.

   ⚠ ATTENTION

   S'assurer de bien mélanger les bibliothèques pour des performances optimales.

3. Sélectionner l'une des options suivantes pour regrouper, dénaturer et diluer les bibliothèques.
   - **[Option 1]** Séquencer les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ARN et d'échantillons d'ADN simultanément. Reportez-vous à l'*Option 1 : Bibliothèques d'ADN et d'ARN ensemble* à la page 79.
   - **[Option 2]** Séquencer les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ADN uniquement. Reportez-vous à l'*Option 2 : Bibliothèques ADN uniquement* à la page 80.
   - **[Option 3]** Séquencer les bibliothèques dérivées d'échantillons d'ARN uniquement. Reportez-vous à l'*Option 3 : Bibliothèques d'ARN uniquement* à la page 81.

Option 1 : Bibliothèques d'ADN et d'ARN ensemble

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse PRL (bibliothèques d'ARN groupé).
2. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse PDL (bibliothèques d'ADN groupé).
3. Transférer 10 µl de chaque bibliothèque d'ARN normalisé (ADNc) de la plaque NL dans le tube PRL.
   Ne pas regrouper deux bibliothèques avec la même primer d'indexation.
4. Transférer 10 µl de chaque bibliothèque d'ADN normalisée de la plaque NL dans le tube PDL.
   Ne pas regrouper deux bibliothèques avec la même primer d'indexation.
5. Appliquer un joint adhésif sur la plaque NL PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits.
6. Mélanger les tubes PRL et PDL à l'aide d'un vortex.
7. Centrifuger brièvement les tubes PRL et PDL.
8. Incuber les tubes PRL et PDL dans un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
9. Garder les tubes PRL et PDL au froid pendant 5 minutes.
10. Mélanger les tubes PRL et PDL à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
11. Garder les tubes PRL et PDL au froid.

Préparer la première dilution

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse DIL1 (Dilution 1).
2. Transférer 20 µl de PDL dans le tube DIL1 vide.
3. Ajouter 5 µl de PRL au tube DIL1.
4. Jeter les tubes PDL et PRL.
5. Ajouter 475 µl de HT1 préréfrigéré dans le tube DIL1 (dilution 1/20).
6. Mélanger le tube DIL 1 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.

Préparer la deuxième dilution

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse de 2,0 ml DIL2 (Dilution 2).
2. Transférer 40 µl de DIL1 dans le tube DIL2 vide.

3. Jeter le tube DIL1.
4. Ajouter 1 660 µl de HT1 préréfrigéré dans le tube DIL2 (dilution au 1/850).
5. Mélanger à l'aide d'un vortex 20 pM dPhiX préparé pour le mélange, puis centrifuger brièvement.
6. Ajouter 2,5 µl de dPhiX préparé à 20 pM dans le tube DIL2.
7. Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
8. Charger 1 300 µl de DIL2 dans la cartouche de réactif à haut débit v2 NextSeq 550Dx décongelée (300 cycles).
   Pour plus d'informations, consulter *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.
9. Jeter le tube DIL2.
10. Centrifuger la plaque NL PCR à 280 × g pendant 1 minute, puis la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 32 jours maximum.
11. Passer au séquençage.
    Pour plus d'informations, consulter *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.

Option 2 : Bibliothèques ADN uniquement

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse PDL (bibliothèques d'ADN groupé).
2. Transférer 10 µl de chaque bibliothèque d'ADN normalisée de la plaque NL dans le tube PDL.
   Ne pas regrouper deux bibliothèques avec la même primer d'indexation.
3. Appliquer un joint adhésif sur la plaque NL PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits.
4. Mélanger le tube PDL à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
5. Incuber le tube PDL dans un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
6. Garder le tube PDL au froid pendant 5 minutes.
7. Mélanger le tube PDL à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
8. Garder le tube PDL au froid.

Préparer la première dilution

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse DIL1 (Dilution 1).
2. Transférer 10 µl de PDL dans le tube DIL1 vide.
3. Jeter le tube PDL.
4. Ajouter 190 µl de HT1 préréfrigéré dans le tube DIL1 (dilution 1/20).
5. Mélanger le DIL1 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.

Préparer la deuxième dilution

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse de 2,0 ml DIL2 (Dilution 2).
2. Transférer 40 µl de DIL1 dans le tube DIL2 vide.
3. Jeter le tube DIL1.
4. Ajouter 1 660 µl de HT1 préréfrigéré dans le tube DIL2 (dilution au 1/850).
5. Mélanger à l'aide d'un vortex 20 pM dPhiX, puis centrifuger brièvement.
6. Ajouter 2,5 µl de dPhiX préparé à 20 pM dans le tube DIL2.
7. Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
8. Charger 1 300 µl de DIL2 dans la cartouche de réactif à haut débit v2 NextSeq 550Dx décongelée (300 cycles).
   Pour plus d'informations, consulter *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.
9. Jeter le tube DIL2.
10. Centrifuger la plaque NL PCR à 280 × g pendant 1 minute, puis la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 32 jours maximum.
11. Passer au séquençage.
    Pour plus d'informations, consulter *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.

Option 3 : Bibliothèques d'ARN uniquement

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse PRL (bibliothèques d'ARN groupé).
2. Transférer 10 µl de chaque bibliothèque d'ARN normalisé (ADNc) de la plaque NL dans le tube PRL.
   Ne pas regrouper deux bibliothèques avec la même primer d'indexation.
3. Appliquer un joint adhésif sur la plaque NL PCR.
   Sceller complètement les bords et les puits pour éviter toute évaporation.
4. Mélanger le tube PRL à l'aide d'un vortex.
5. Centrifuger brièvement le tube PRL.
6. Incuber le tube PRL dans un bloc chauffant à 96 °C pendant 2 minutes.
7. Garder le tube PRL au froid pendant 5 minutes.
8. Mélanger le tube PRL à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
9. Garder le tube PRL au froid.

Préparer la première dilution

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse DIL1 (Dilution 1).
2. Transférer 10 µl de PRL dans le tube DIL1 vide.

3. Jeter le tube PRL.
4. Ajouter 190 µl de HT1 préréfrigéré dans le tube DIL1 (dilution 1/20).
5. Mélanger le tube DIL1 à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.

Préparer la deuxième dilution

1. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse de 2,0 ml DIL2 (Dilution 2).
2. Transférer 40 µl de DIL1 dans le tube DIL2 vide.
3. Jeter le tube DIL1.
4. Ajouter 1 646 µl de HT1 préréfrigéré dans le tube DIL2 (dilution 1/843).
5. Mélanger à l'aide d'un vortex 20 pM dPhiX, puis centrifuger brièvement.
6. Ajouter 16,7 µl de dPhiX préparé à 20 pM dans le tube DIL2.
7. Mélanger à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement.
8. Charger 1 300 µl de DIL2 dans la cartouche de réactif à haut débit v2 NextSeq 550Dx décongelée (300 cycles).
   Pour plus d'informations, consulter *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.
9. Jeter le tube DIL2.
10. Centrifuger la plaque NL PCR à 280 × g pendant 1 minute et la conserver entre -25 °C et -15 °C pendant 32 jours maximum.
11. Passer au séquençage.
    Pour plus d'informations, consulter *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.

Interprétation des résultats

Les résultats de séquençage du test TSO Comprehensive (EU) sont rapportés pour chaque échantillon individuellement dans un rapport PDF et un rapport JSON. Un rapport de faible profondeur (`LowDepthReport.tsv`) est également généré au niveau de l'échantillon.

Au niveau de l'exécution, les fichiers de sortie suivants sont générés :

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

Seuls les variants qui réussissent le contrôle qualité apparaissent dans les rapports PDF et JSON.

Pour des informations détaillées sur l'analyse, consulter *Guide de flux de travail du Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661)*.

Résultats de diagnostiques compagnons

Pour chaque diagnostic compagnon (CDx) prévu, il existe trois résultats possibles :

- **Positif** : un variant ou un biomarqueur est détecté et classé au niveau 1 (CDx).
- **Non détecté** : aucun variant ou biomarqueur associé à l'utilisation prévue du CDx n'est détecté dans l'échantillon. Le type de tumeur sélectionné pour l'échantillon est approprié pour le CDx.
- **Aucun résultat** : la détermination d'un statut de variant n'est pas possible pour une ou plusieurs des raisons suivantes :
  - L'utilisation prévue du CDx n'est pas applicable à l'échantillon testé, car le type de tumeur sélectionné pour l'échantillon n'est pas approprié pour le type de tumeur du CDx.
  - Le séquençage a échoué aux spécifications de contrôle qualité.
  - La bibliothèque n'a pas répondu aux spécifications de contrôle qualité requises.
  - L'acide nucléique approprié n'a pas été analysé.

Tous les résultats de l'utilisation prévue de CDx sont rapportés dans la section Résultats de diagnostiques compagnons du rapport JSON. Seules les utilisations prévues avec un résultat positif sont répertoriées dans la section Résultats de diagnostiques compagnons du rapport PDF.

Variants du profilage tumoral

TSO Comprehensive (EU) est conçu pour rapporter les variants somatiques lors du rapport des variants avec des preuves de signification clinique ou des variants avec une signification clinique potentielle. Le logiciel de test TSO Comprehensive (EU) utilise une KB qui détermine si chaque variant détecté et éligible (Tableau 2) est cliniquement ou potentiellement cliniquement significatif, en fonction des preuves d'associations thérapeutiques, diagnostiques ou pronostiques. La KB considère également si des associations sont établies (ou non) dans le type de tumeur testé. Les associations de sensibilité ou de risque de cancer ne sont pas incluses dans la KB. Les polymorphismes courants sont éliminés.

Pour les variants du profilage tumoral, les résultats positifs sont classés en résultats génomiques ayant une signification clinique évidente (niveau 2) ou résultats génomiques ayant une signification clinique potentielle (niveau 3) en fonction de la KB installée et du type de tumeur identifié.

Les échecs du contrôle qualité n'entraînent aucun résultat pour les types de variants pertinents pour la mesure de contrôle qualité échouée. Reportez-vous au Tableau 40 et au Tableau 41 pour plus d'informations. Les positions de profilage tumoral avec une profondeur insuffisante sont répertoriées dans le rapport de faible profondeur et non dans le rapport TSO Comprehensive (EU).

Contrôle qualité

- Pour plus d'informations sur la quantification de l'acide nucléique et les exigences minimales en matière d'entrée, Consulter *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28.

- La durée de séquençage et la validité de l'échantillon sont déterminées automatiquement et rapportées par le Module d'analyse TSO Comprehensive (EU). Pour des informations détaillées sur l'analyse, consulter *Guide de flux de travail du Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661)*.
- Le rapport TSO Comprehensive (EU), disponible aux formats PDF et JSON, résume les résultats du contrôle qualité. Les fichiers de rapports se trouvent dans le dossier d'analyse. Consulter *Guide de flux de travail du Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661)* pour connaître l'emplacement du dossier d'analyse (contient les rapports PDF et JSON) et le dossier d'exécution.

Tableau 40 TSO Comprehensive (EU) Métriques CQ des résultats du rapport

Type de sortie	Indicateur	Spécification	Description	Impact de la défaillance de spécification*
Analyse de séquençage	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Pourcentage de lectures passant le filtre (PF).	Cycle de séquençage invalidé. Aucun résultat n'a été rapporté pour aucun échantillon de l'analyse.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Pourcentage moyen de définitions de base avec un score de qualité de Q30 ou supérieur pour la lecture 1.	Cycle de séquençage invalidé. Aucun résultat n'a été rapporté pour aucun échantillon de l'analyse.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Pourcentage moyen de définitions de base avec un score de qualité Q30 ou supérieur pour la lecture 2.	

Type de sortie	Indicateur	Spécification	Description	Impact de la défaillance de spécification*
Bibliothèques d'ADN	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3 106 OU > 3 106 et P_VALUE ≤ 0,049	Mesure évaluant la probabilité de contamination à l'aide du VAF des variants courants. Le score de contamination est basé sur la distribution VAF des SNP. La valeur P de contamination est utilisée pour évaluer les génomes fortement réorganisés. Elle ne s'applique que lorsque le score de contamination est supérieur à la limite supérieure des spécifications.	Aucun résultat d'ADN n'a été rapporté.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	La longueur médiane du fragment pour chaque index d'échantillon.	Aucun résultat TMB ou petit variant d'ADN n'a été rapporté.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (nombre)	≥ 150	Couverture médiane des fragments d'exon sur toutes les bases d'exon.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Pourcentage de bases d'exon avec une couverture de fragment 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (nombre)	≥ 40	Le nombre de sites MSI utilisables pour les définitions MSI (nombre de sites microsatellites avec des lectures d'étendue suffisantes pour identifier l'instabilité des microsatellites).	Aucun résultat MSI n'a été rapporté.
	COVERAGE_MAD (nombre)	≤ 0,210	La médiane des écarts absolus par rapport à la médiane du nombre normalisé de chaque région cible de NVC.	Aucun résultat d'amplification génétique n'a été rapporté.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (nombre)	≥ 1,0	Nombre médian de bacs bruts par cible CNV.	

Type de sortie	Indicateur	Spécification	Description	Impact de la défaillance de spécification*
Bibliothèques d'ARN	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	La longueur médiane du fragment pour chaque index d'échantillon.	Aucun résultat de fusions ou de variants d'épissage n'a été rapporté.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (coefficient)	≤ 0,93	MEDIAN_CV_GENE_500X est une mesure de l'uniformité de la couverture. Pour chaque gène avec une couverture d'au moins 500x, le coefficient de variation de la couverture à travers le corps du gène est calculé. Cette mesure est la médiane de ces valeurs. Une valeur élevée indique un niveau élevé de variation et indique un problème dans la préparation de la bibliothèque, tel qu'un faible niveau d'entrée d'échantillon et/ou des problèmes de retrait de sonde. Cette mesure est calculée en utilisant toutes les lectures (y compris les lectures marquées comme doubles).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (nombre)	≥ 9 000 000	Le nombre total de lectures qui correspondent aux régions cibles. Cette mesure est calculée en utilisant toutes les lectures (y compris les lectures marquées comme doubles).	

* Les résultats réussis portent la mention PASS.

Tableau 41 TSO Comprehensive (EU) Métriques de contrôle des résultats du rapport

Type de sortie	Indicateur	Spécification	Impact de la défaillance de spécification*
Contrôle positif	Contrôle externe ADN	23 des 24 variants spécifiés détectés	Invalider manuellement les échantillons du patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle. Le logiciel du module d'analyse n'invalide pas automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle.
	Contrôle externe ARN	12 des 13 variants spécifiés détectés	
Contrôle sans modèle	Couverture médiane des exons d'ADN pour TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Invalider manuellement les échantillons du patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle. Le logiciel du module d'analyse n'invalide pas automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle.
	Gène de l'ARN au-dessus du seuil médian	≤ 1	

* Les résultats réussis portent la mention PASS.

- Répéter les analyses de séquençage invalides.
- Répéter les tests des bibliothèques avec les résultats suivants :
  - Bibliothèques d'ADN contaminées
  - Bibliothèques d'ARN invalides
  - Les tests peuvent être répétés pour obtenir plus de résultats de variants ou de biomarqueurs pour les bibliothèques d'ADN qui ont été invalidées pour un type de variants, mais pas tous.
- Les contrôles positifs sont évalués pour la définition des variants. Si les contrôles positifs ne répondent pas aux spécifications de définition des variants, invalider manuellement le séquençage. Le logiciel du module d'analyse n'invalide pas automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle.
- Les NTC sont évalués par rapport à la couverture exponentielle médiane pour l'ADN et les gènes au-dessus du seuil médian pour l'ARN. Si les contrôles négatifs ne répondent pas aux spécifications, invalider manuellement l'événement de préparation de la bibliothèque et toutes les analyses de séquençage associées. Le logiciel du module d'analyse n'invalide pas automatiquement les échantillons de patient en fonction des résultats des échantillons de contrôle.
- Effectuer des mesures de contrôle qualité supplémentaires conformément aux réglementations locales, étatiques et/ou fédérales ou aux exigences d'accréditation.

Pour plus d'informations sur la répétition des analyses de séquençage ou des tests des bibliothèques, consulter *Dépannage* à la page 88.

Dépannage

Utilisez le tableau suivant pour résoudre les problèmes dans le flux de travail. Si un séquençage ou une préparation de bibliothèque pour un échantillon échoue deux fois, un dépannage supplémentaire est nécessaire. Contacter l'assistance technique Illumina.

Observation	Cause possible	Action recommandée
Le séquençage ne réussit pas les spécifications de contrôle qualité.	• Erreur de regroupement • Erreur de dilution • Dénaturation thermique incomplète de PRL/PDL • Problèmes liés à la préparation des consommables de séquençage (par exemple, décongélation insuffisante, condensation/débris sur la flow cell)	• Reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR pour les bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section *Préparation au séquençage* à la page 77.
	• Mauvaise utilisation des sondes d'enrichissement (par exemple, sondes OPR1 utilisées pour les échantillons d'ADN, sondes OPD2 utilisées pour les échantillons d'ARN) • Erreur dans le flux de travail de préparation de la bibliothèque pendant ou après la première étape d'hybridation	Répéter les étapes d'enrichissement pour les bibliothèques de la plaque PCR d'Échantillons de bibliothèques amplifiées (ALS). Consulter la section *Configuration de la première hybridation* à la page 60.
	Les exigences pour la saisie d'échantillons n'ont pas été satisfaites	Commencer la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail. Consulter la section *Dénaturation et recuit de l'ARN* à la page 45 ou *Fragmentation de l'ADNg* à la page 50.

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.

Observation	Cause possible	Action recommandée
	Erreur dans le flux de travail de préparation de la bibliothèque pendant ou avant l'étape d'indexation PCR	Répéter les étapes d'enrichissement pour les bibliothèques de la plaque PCR d'Échantillons de bibliothèques amplifiées (ALS). Consulter la section *Configuration de la première hybridation* à la page 60.
	Problème d'instrument	Contacter l'assistance technique Illumina.
Erreur de génération de rapport ou erreur générale de l'instrument (erreur réseau, erreurs de chargement/déchargement des réactifs, etc.).	Problème de logiciel ou d'instrument	Consulter le Guide de flux de travail du Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661) pour obtenir de l'aide sur la génération de rapports. Contactez l'assistance technique Illumina pour obtenir davantage d'aide.
La bibliothèque d'ADN ne répond pas aux spécifications de contrôle qualité.	Les exigences pour la saisie d'échantillons n'ont pas été satisfaites.	S'assurer que l'échantillon est correctement saisi et répéter la préparation de la bibliothèque à partir de l'étape Fragmentation de l'ADNg. Consulter la section *Exigences relatives aux échantillons* à la page 27 et *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28.

Observation	Cause possible	Action recommandée
	Erreur d'utilisation ou d'équipement dans le flux de travail du test	Répétez la préparation de la bibliothèque à partir de l'une des étapes suivantes en fonction de l'endroit où l'utilisation suspectée ou l'erreur d'équipement s'est produite. En cas d'inconnu ou d'autres erreurs, contactez l'assistance technique Illumina pour dépanner votre exécution. • Reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR pour les bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section *Préparation au séquençage* à la page 77. • Répéter les étapes d'enrichissement pour les bibliothèques de la plaque PCR d'Échantillons de bibliothèques amplifiées (ALS). Consulter la section *Configuration de la première hybridation* à la page 60. • Commencer la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail. Consulter la section *Fragmentation de l'ADNg* à la page 50.
	Les critères CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE ne sont pas satisfaits.	Consulter les avertissements et précautions pour obtenir des informations sur la façon d'éviter la contamination croisée. Examiner la disposition des plaques et l'indexation des bibliothèques pour s'assurer que les bibliothèques du même index n'ont pas été séquencées ensemble. Pour les bibliothèques affectées, commencer la préparation de la bibliothèque dès le début du flux de travail. Consulter la section *Fragmentation de l'ADNg* à la page 50. Une contamination pourrait s'être produite pendant l'extraction de l'échantillon. Il pourrait être nécessaire de répéter l'extraction pour s'assurer que l'échantillon est exempt de contamination.

Observation	Cause possible	Action recommandée
	Échec MSI utilisable	Examiner les paramètres du fabricant de l'appareil à ultrasons pour l'utilisation et le fonctionnement (y compris le niveau d'eau et le type de tube). S'assurer que l'échantillon est correctement saisi dans le test. Consulter la section *Exigences relatives aux échantillons* à la page 27 et *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28. Une nouvelle extraction de l'échantillon et/ou la répétition de l'étape Fragmentation de l'ADNg pourraient être nécessaires si l'échantillon est trop fragmenté ou endommagé.
	L'échantillon est trop fragmenté ou présente des dommages à l'acide nucléique qui ont un impact sur la capacité à générer suffisamment de bibliothèques uniques.	Examiner les paramètres de configuration de l'*Paramètres de configuration de l'appareil à ultrasons pour la fragmentation de l'ADN* à la page 23 et les paramètres du fabricant de l'appareil à ultrasons en matière d'utilisation et de fonctionnement (y compris le niveau d'eau et le type de tube). S'assurer que l'échantillon est correctement saisi dans le test. Consulter la section *Exigences relatives aux échantillons* à la page 27 et *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28. Une nouvelle extraction de l'échantillon et/ou la répétition de l'étape Fragmentation de l'ADNg pourraient être nécessaires si l'échantillon est trop fragmenté ou endommagé.
La bibliothèque d'ARN ne répond pas aux spécifications de contrôle qualité.	Les exigences pour la saisie d'échantillons n'ont pas été satisfaites.	S'assurer que l'échantillon est correctement saisi et répéter la préparation de la bibliothèque à partir de l'étape Dénaturation et recuit de l'ARN. Consulter la section *Exigences relatives aux échantillons* à la page 27 et *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28.

Observation	Cause possible	Action recommandée
	Erreur d'utilisation ou d'équipement dans le flux de travail du test	Répétez la préparation de la bibliothèque à partir de l'une des étapes suivantes en fonction de l'endroit où l'utilisation suspectée ou l'erreur d'équipement s'est produite. En cas d'inconnu ou d'autres erreurs, contactez l'assistance technique Illumina pour dépanner votre exécution. • Reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR pour les bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section *Préparation au séquençage* à la page 77. • Répéter les étapes d'enrichissement pour les bibliothèques de la plaque PCR d'Échantillons de bibliothèques amplifiées (ALS). Consulter la section *Configuration de la première hybridation* à la page 60. • Commencer la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail. Consulter la section *Dénaturation et recuit de l'ARN* à la page 45.
	L'échantillon est trop fragmenté ou présente des dommages à l'acide nucléique qui ont un impact sur la capacité à générer suffisamment de bibliothèques uniques.	S'assurer que l'échantillon est correctement saisi. Consulter la section *Exigences relatives aux échantillons* à la page 27 et *Extraction, quantification et stockage des acides nucléiques* à la page 28. Une nouvelle extraction d'échantillon pourrait être nécessaire si l'échantillon est trop fragmenté ou endommagé.

Observation	Cause possible	Action recommandée
Échec du contrôle positif (ADN/ARN).	Les exigences relatives à l'entrée d'échantillon pour le contrôle positif n'ont pas été satisfaites.	S'assurer de la saisie appropriée dans le test. Examiner la disposition des plaques et s'assurer que les réactifs appropriés (sonde, index) se trouvent dans les puits appropriés. S'assurer que l'échantillon de contrôle positif est conservé conformément à l'étiquette. Pour tous les échantillons qui partagent le contrôle positif, répéter la préparation de la bibliothèque à partir de l'une des étapes suivantes en fonction de l'endroit où l'utilisation suspectée ou l'erreur d'équipement s'est produite. En cas d'inconnu ou d'autres erreurs, contactez l'assistance technique Illumina pour dépanner votre exécution. • Reséquencer les bibliothèques de la plaque PCR pour les bibliothèques normalisées (NL). Consulter la section *Préparation au séquençage* à la page 77. • Répéter les étapes d'enrichissement pour les bibliothèques de la plaque PCR d'Échantillons de bibliothèques amplifiées (ALS). Consulter la section *Configuration de la première hybridation* à la page 60. • Commencer la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail. Consulter la section *Dénaturation et recuit de l'ARN* à la page 45 ou *Fragmentation de l'ADNg* à la page 50.
	Erreur d'utilisation ou d'équipement dans le flux de travail du test.	

Observation	Cause possible	Action recommandée
Échec NTC (ADN/ARN).	Contamination croisée ou contamination de la zone de travail	Consulter la section Avertissements et précautions pour obtenir des informations sur la décontamination des zones de travail et éviter une contamination croisée. Examiner la disposition des plaques et l'indexation des bibliothèques pour s'assurer que les bibliothèques du même index n'ont pas été séquencées ensemble. Répéter la préparation de la bibliothèque depuis le début du flux de travail pour toutes les bibliothèques qui partagent le contrôle sans modèle.
	Indexation incorrecte de la bibliothèque	
Le logiciel indique que les contrôles positifs et/ou négatifs n'ont pas été inclus dans le séquençage.	Attribution incorrecte du type de cancer dans la planification de l'analyse Local Run Manager	Mettre l'analyse en file d'attente avec les contrôles correctement identifiés comme indiqué dans le Guide de flux de travail du Module d'analyse (consulter *Guide de flux de travail du Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661)*).

Caractéristiques de performances

TSO Comprehensive (EU) est un panel de NGS ciblé qui détecte les altérations dans 517 gènes. Les petits variants de l'ADN (variants nucléotidiques uniques (SNV), variants nucléotidiques multiples (MNV), insertions et délétions), sont éligibles pour le signalement à partir des 517 gènes. La charge mutationnelle tumorale est rapportée sous forme de score basé sur le nombre de variants somatiques non conducteurs par mégabase (voir *Guide de flux de travail du Module d'analyse Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (document n° 200008661)* pour plus de détails). MSI est signalé comme statut. Les amplifications génétiques peuvent être rapportées à partir des gènes MET et ERBB2. Les fusions peuvent être rapportées à partir des 23 gènes indiqués dans *Résumé et explication du test* à la page 1. Les variants d'épissage sont éligibles pour le signalement à partir des gènes MET et EGFR. Pour être signalés, les variants doivent être détectés et avoir des preuves dans la KB du test TSO Comprehensive (EU) et être éligibles en fonction du type de tissu testé. Pour être rapportées, les fusions NTRK nécessitent que le partenaire de fusion soit 5' et que le domaine kinase NTRK soit intact.

Pour les petits variants de l'ADN, une approche représentative de la validation des gènes ciblés dans le panel a été menée avec des données représentant les SNV, les MNV, les insertions et les délétions. Pour les amplifications, fusions et variants d'épissage du gène, des tests ont été effectués au niveau du gène. La TMB et la MSI ont été évaluées lorsque cela était indiqué. Pour les revendications CDx des fusions NTRK, les fusions

dans les échantillons FFPE ont été testées dans des études axées sur les performances spécifiques à la revendication (telles que la limite de détection, la précision intra-laboratoire, la reproductibilité, la précision et les performances cliniques).

Le Tableau 42 fournit les définitions des métriques calculées dans diverses études.

Tableau 42 Définitions des métriques

Terme	Définition
Pourcentage de concordance positive (PPA)	Le pourcentage de positifs correctement identifiés à partir du nombre total de positifs par rapport à une méthode orthogonale.
Pourcentage de concordance négative (NPA)	Pourcentage de négatifs correctement identifiés à partir du total des négatifs par rapport à une méthode orthogonale.
Pourcentage global de concordance (PCG)	Pourcentage de positifs et de négatifs correctement identifiés à partir de l'observation totale par rapport à une méthode orthogonale.
Pourcentage de définition positive (PPC)	Pourcentage d'observations positif pour une cible parmi les observations qui devraient être positives pour la cible.
Pourcentage de détections négatif (PNC)	Pourcentage d'observations négatif pour une cible parmi les observations qui devraient être négatives pour la cible.
n/N	Nombre d'observations positives ou négatives (n) divisé par le nombre total d'observations (N) pour calculer le PPC ou le PNC, respectivement. Les valeurs de n et N peuvent être à différents niveaux (p. ex., variant ou gène) ou combinées dans un groupe (p. ex., SNV).
Écart-type (SD)	Mesure de la quantité de variation des valeurs d'une variable par rapport à sa moyenne.
Coefficient de variation en pourcentage (% CV)	Écart-type divisé par la moyenne en pourcentage.

Contamination croisée

L'étude de contamination croisée a été menée pour évaluer si les résultats faux positifs étaient dus à la contamination de puits en puits lors de la préparation de la bibliothèque d'échantillons ou à la contamination de séquençage en séquençage entre deux séquençages consécutifs. Cette analyse a été réalisée pour les petits variants de l'ADN (qui ont également un impact sur le TMB), les fusions, les amplifications génétiques et le MSI.

Les bibliothèques ont été préparées à partir des échantillons définis dans une disposition en damier avec des échantillons alternés pour évaluer la contamination de puits à puits, et avec des index alternés pour évaluer la contamination de séquençage d'un cycle à l'autre lorsqu'ils sont séquencés consécutivement sur le même Instrument NextSeq 550Dx. L'étude de contamination croisée n'a montré aucun événement de contamination observé en examinant les variants détectés dans chaque échantillon, sans faux positifs détectés.

Deux indicateurs de CQ (CONTAMINATION_SCORE et P_VALUE) ont été conçus pour le test TSO Comprehensive (EU) afin de détecter une contamination dans les échantillons d'ADN. La sensibilité de la détection de contamination a été évaluée. Les échantillons d'ADN tumoral FFPE ont été mélangés à des quantités variables d'échantillons d'ADN normaux FFPE afin de créer des échantillons délibérément contaminés.

Au total, 1 112 observations de contamination ont été générées, et une contamination a été détectée dans 95 % (1 054) des observations. Le taux de détection a atteint 96 % (939/976) lorsque le pourcentage de contamination était compris entre 10 % et 90 % (masse/masse). Sur les 37 observations comprises entre 10 % et 90 % de contamination où aucune contamination n'a été détectée, 12 n'ont pas satisfait aux spécifications de couverture pour l'identification des petits variants d'ADN. La faible couverture empêche la détection des contaminations, mais les petits variants d'ADN ne sont pas signalés, atténuant ainsi tout effet de contamination. Quinze observations n'ont pas satisfait à la spécification d'amplification génétique (mesure CQ du nombre médian de bacs) pour pouvoir qualifier l'amplification génétique. Aucun résultat ne sera rapporté pour les échantillons en matière d'amplification génétique.

L'étude a démontré que le test TSO Comprehensive (EU) devrait avoir une faible occurrence de contamination croisée d'un puits à l'autre ou d'un séquençage à l'autre. Ces résultats, ainsi que les indicateurs de contamination du logiciel, atténuent le risque de faux résultats de variants dus à la contamination des échantillons.

Évaluation de la trousse d'extraction d'acide nucléique

Trois trousses d'extraction d'ADN et d'ARN disponibles dans le commerce ont été évalués avec TSO Comprehensive (EU). Les trois trousses d'extraction ont isolé à la fois l'ADN et l'ARN des mêmes coupes de tissu FFPE. Les trousses différaient en termes d'agent de déparaffinage et d'étapes de liaison à l'acide nucléique (Tableau 43). La trousse 1 était la trousse d'extraction prédominante utilisée pour déterminer les TSO Comprehensive (EU) performances.

Tableau 43 Caractéristiques de la trousse

Trousse	Agent de déparaffinage	Liaison aux acides nucléiques
1	Exclusif	Colonne
2	Xylène	Colonne
3	Huile minérale	Billes magnétiques

Le Tableau 44 et le Tableau 45 résument les effets des trousses d'extraction sur la validité de la bibliothèque et la définition des variants. La différence a été rapportée si les moyennes de la trousse d'extraction étaient significativement différentes. Les différences moyennes entre les trousses d'extraction ont été calculées avec la Trousse 1 comme contrôle, car cette dernière a été utilisée pour extraire la plupart des acides nucléiques

utilisés pour les études analytiques de TSO Comprehensive (EU). La différence moyenne par rapport à la Trousse 1 a été rapportée pour illustrer la manière dont différentes trousses d'extraction pourraient affecter les autres études analytiques de TSO Comprehensive (EU).

Tableau 44 Impacts de la trousse d'extraction sur la validité de la bibliothèque

Type de variant	Indicateur CQ de bibliothèque	Différence moyenne par rapport à la Trousse 1
Petits variants d'ADN/TMB	Couverture médiane des exons (nombre) PCT Exon 50X (%) Taille médiane de l'insert (bp)	Trousse 2 inférieure de 56 lectures Trousse 3 supérieure de 0,298 % Trousse 2 et Trousse 3 inférieures de 3 bp
MSI ADN	Sites MSI utilisables	Trousse 3 supérieure de 8 sites
Amplification génétique de l'ADN	Couverture MAD (nombre)	Trousse 2 inférieure de 0,0043
	Nombre médian de bacs	Trousse 2 inférieure de 0,5825, Trousse 3 supérieure de 0,3086
ARN (Variants de fusions/épissages)	Taille médiane de l'insert (bp) Journal (CV Gene500X médian) Total sur les lectures cibles	Trousse 3 supérieure de 2 bp Trousse 2 supérieure de 0,029 Aucune différence significative

Il a été observé que les Trousses d'extraction 2 et 3 présentaient des lectures justificatives supérieures, de sorte que les fusions et les variants d'épissage proches de la LoD avaient une probabilité de détection supérieure en raison de la sélection de la trousse d'extraction.

Tableau 45 Impacts de la trousse d'extraction sur la définition des variants

Type de variant (unités)	Définition de variant (différence moyenne par rapport à la Trousse 1)
Petits variants d'ADN (VAF)	Non techniquement significatif Variants ciblés : la variance entre les trousses était faible par rapport au résiduel Variants non ciblés : aucune différence significative pour les deux premiers bacs VAF. Aucune différence significative lorsque la signification statistique était observée.
TMB (mutation par mégabase)	Non significatif sur le plan technique, la variance entre les trousses était faible par rapport au résiduel
MSI (% sites instables)	Trousse 3 inférieure de 1,9 % de sites instables
Amplification génétique (changement de facteur)	Changement de facteur supérieur pour la Trousse 2 (0,06) et la Trousse 3 (0,08)
Fusions (lectures justificatives)	La Trousse 2 présentait 51 % et la Trousse 3 présentait 23 % d'augmentation des lectures justificatives
Variantes d'épissure (lectures justificatives)	La Trousse 2 et la Trousse 3 présentaient 48 % d'augmentation des lectures justificatives

Substances interférentes

L'impact des substances endogènes et exogènes potentielles sur la performance du test TSO Comprehensive (EU) a été évalué. Des substances endogènes (mélanine et hémoglobine) ont été ajoutées aux échantillons pendant le processus d'extraction de l'acide nucléique. Des substances exogènes (éthanol, xylène et protéinase K) étaient présentes pendant le processus d'extraction de l'acide nucléique, et elles ont également été percées dans l'acide nucléique purifié avant la préparation de la bibliothèque. Lorsque des interférences ont été observées avec la protéinase K enrichie, des concentrations accrues de protéinase K ont également été évaluées pendant le processus d'extraction. Des primers d'indexations en excès (15 % et 30 %) ont été ajoutées pendant la préparation de la bibliothèque. Hormis pour les primers d'indexation, des substances ont été ajoutées aux échantillons FFPE provenant du cerveau, du sein, du côlon, du poumon, de la thyroïde médullaire, du CPNPC, de l'ovaire, de la prostate, de la salive, de la peau, de tissus mous et de tissus thyroïdiens ; huit échantillons ont été extraits pour l'analyse de l'ADN et 13 pour l'analyse de l'ARN. Pour les primers d'indexation, six échantillons FFPE provenant de trois types de tissus différents (thyroïde, vessie, côlon) ont été utilisés pour l'analyse de l'ADN et cinq échantillons FFPE provenant de quatre types de tissus différents (poumon, thyroïde, côlon, sein) ont été utilisés pour l'analyse de l'ARN. Il y a eu un contrôle endogène non enrichi et un contrôle exogène tamponné ou enrichi d'eau pour chacun des 16 échantillons. L'effet de la nécrose a été évalué sur un ensemble différent de huit échantillons FFPE provenant de tissus cérébraux, coliques et pulmonaires. Il y avait un contrôle macrodisséqué sans nécrose pour chaque échantillon de nécrose. Pour tous les interférents, quatre réplicats par échantillon par substance ont été testés avec le test TSO Comprehensive (EU) et comparés à leur condition de contrôle respectif pour la détection de petits variants d'ADN, d'amplifications génétiques, de fusions d'ARN et de variants d'épissage d'ARN, ainsi que pour le statut MSI et le score TMB. Les variants CDx et de profilage tumoral ont été inclus.

Détection des variants d'ADN

La mélanine (0,2 µg/ml), l'hémoglobine (2 mg/ml), l'éthanol (5 %), la protéinase K (0,04 mg/ml dans l'acide nucléique) et le xylène (0,0001 %) n'interfèrent pas avec le score TMB, le statut MSI, les petits variants de l'ADN et les amplifications génétiques.

Détection des variants d'ARN

Les données ne soutiennent aucune interférence de la mélanine (0,2 µg/ml), de l'éthanol (5 %) et du xylène (0,0001 %) sur les fusions d'ARN ou les variants d'épissage. L'hémoglobine (2 mg/ml) a interféré (réduction des lectures justificatives) avec trois variants d'épissage différents dans le gène MET. Un variant d'épissage dans le gène AR (trois échantillons différents) et un autre dans le gène EGFR (un échantillon) n'ont pas été affectés. Si le laboratoire analyse l'ARN avec le test, les tissus présentant de l'hémoglobine doivent être évités ou minimisés lors de la réalisation de coupes à partir du bloc de tissu.

La protéinase K (0,04 mg/ml dans l'acide nucléique) a interféré avec les fusions d'ARN et les variants d'épissage. La protéinase K a été testée à 2,6 mg/ml et 5,2 mg/ml pendant le processus d'extraction, soit 2x et 4x la concentration standard dans une trousse disponible dans le commerce. Les fusions ont été inhibées à 4x

mais pas à 2x la protéinase K. Les variants d'épissage ont été inhibés à 2x la protéinase K. La protéinase K ou enzyme équivalente ne doit pas être augmentée pendant l'extraction à partir de la concentration standard fournie dans une trousse d'extraction.

Les lectures des variants d'épissage diminuent avec 30 % de primers d'indexation en excès, mais pas avec 15 % en excès.

Nécrose

La présence de tissu nécrotique jusqu'à 70 % n'a pas interféré avec le score TMB, le statut MSI ou les petits variants d'ADN. Les variants d'ARN (lectures justificatives) et la détection (changement de facteur) de l'amplification génétique ont diminué dans les échantillons présentant un contenu nécrotique ≥ 25 % et ≥ 23 % (par zone) dans la zone tissulaire, respectivement. Si les sections d'échantillon contiennent plus de 23 % de nécrose dans la surface totale du tissu, le tissu nécrotique doit être macrodisséqué.

Stabilité

Stabilité en temps réel

La stabilité en temps réel a été utilisée pour établir la durée de conservation de la trousse de test TSO Comprehensive (EU) lorsqu'elle était conservée conformément aux conditions de l'étiquette. La conception de l'étude a reposé sur l'analyse de trois lots de réactifs et a utilisé la conception classique de l'étude de stabilité décrite dans le CLSI EP25-A. Les trousses ont été conservées dans la configuration finale en trousse pendant toute la durée de l'étude, dans les conditions de conservation définies sur l'étiquette du produit. Les composants de la trousse congelés ont été conservés entre -15 °C et -25 °C. Les composants de la trousse réfrigérés ont été conservés entre 2 °C et 8 °C.

Les trousses ont été testées pour l'apparence et les critères fonctionnels de libération des trousses à des points temporels spécifiés. En outre, les tendances des mesures de CQ des variants et des échantillons ont été analysées pour le matériel de contrôle CQ. La durée de conservation a été déterminée pour chaque réactif. Les dates de péremption sont attribuées en fonction de la date de fabrication et de la durée de conservation. La péremption de la trousse est attribuée en fonction du réactif qui expire le plus tôt.

Stabilité en cours d'utilisation de la trousse

La stabilité en cours d'utilisation de la trousse de test TSO Comprehensive (EU) a été évaluée dans des conditions d'utilisation standard tout au long de la durée de conservation afin de prendre en charge plusieurs utilisations de la trousse. La trousse de réactifs a été soumise à plusieurs congélations/décongélations et testée pour prendre en charge jusqu'à 4 utilisations de la trousse. En outre, 8 bibliothèques d'ARN et 8 bibliothèques d'ADN ont été préparées 3 fois au total pour tester le nombre maximum de bibliothèques prises en charge (24 bibliothèques d'ADN et 24 bibliothèques d'ARN par trousse). Tous les critères fonctionnels de libération de la trousse ont été remplis pour tous les cycles de congélation-décongélation et les points temporels testés. Des tests des échantillons FFPE avec des réactifs âgés de ≥ 25 mois ont été effectués pour évaluer l'impact des tests en cours d'utilisation sur la définition des variants. Une analyse qualitative des variants ciblés démontre que les événements en cours d'utilisation n'ont pas affecté la définition des variants.

Stabilité des acides nucléiques

La stabilité des acides nucléiques (ADN et ARN) et leur quantification associée pour une utilisation avec le TSO Comprehensive (EU) test a été évaluée à l'aide d'échantillons FFPE provenant de plusieurs types de tissus. Les blocs FFPE ont été sectionnés et tous les acides nucléiques ont été extraits en même temps. L'acide nucléique extrait a été soigneusement mélangé, quantifié, vérifié en matière de qualité et aliquoté dans deux ensembles de tubes à usage unique à congeler pour deux points temporels : T0 contrôle (référence) et T1 test (≥ 28 jours). Tout l'ARN extrait a été conservé entre -85 °C et -65 °C et tout l'ADN extrait a été conservé entre -25 °C et -15 °C pendant les durées indiquées, puis ils ont été traités par le test TSO Comprehensive (EU) sur plusieurs réplicats et opérateurs. L'état du test T1 a été comparé au contrôle en matière de statut MSI, score TMB, amplifications génétiques, petits variants d'ADN, fusions d'ARN et variants d'épissage d'ARN. Les données indiquent que les acides nucléiques et leur quantification associée pour une utilisation avec le test TSO Comprehensive (EU) sont stables jusqu'à 28 jours lorsqu'ils sont conservés aux températures recommandées (ARN entre -85 °C et -65 °C et ADN entre -25 °C et -15 °C).

Stabilité de la bibliothèque

La stabilité des bibliothèques utilisant chacun des six points d'arrêt sûrs pour le test (voir Tableau 5) a été évaluée à l'aide d'échantillons FFPE provenant de plusieurs types de tissus. Les bibliothèques de contrôle (T0, aucun point d'arrêt) ont été séquencées immédiatement à la fin du flux de travail. Des aliquotes provenant des mêmes bibliothèques ont été conservées aux points d'arrêt entre -25 °C et -15 °C pendant la durée (T1) pour soutenir les jours énumérés dans le Tableau 5. La T1 a été comparée à la T0 pour les petits variants de l'ADN, la TMB, les amplifications de gènes, les MSI, les fusions d'ARN et les variants d'épissage d'ARN avec CDx et les variants de profilage tumoral. Les données indiquent que les bibliothèques générées à partir du TSO Comprehensive (EU) test sont stables conformément au mode d'emploi.

Stabilité des tissus FFPE montés sur lame

La stabilité des tissus FFPE montés sur lame à utiliser avec le test TSO Comprehensive (EU) a été évaluée en sectionnant des blocs FFPE (sections de 5 µm) à partir d'échantillons uniques fixés sur des lames, puis conservés à température ambiante (22 °C) pendant 2 points temporels. L'ARN a été extrait et conservé entre -65 °C et -85 °C, et l'ADN a été extrait et conservé entre -15 °C et -25 °C pendant moins d'une semaine avant l'analyse. L'acide nucléique a été quantifié puis traité par le test TSO Comprehensive (EU) dans les 24 heures pour chaque point temporel. À chaque point temporel, plusieurs réplicats et opérateurs ont été testés avec le test TSO Comprehensive (EU) pour chaque échantillon, et comparés au point temporel T0 pour la MSI, le TMB, les amplifications génétiques, les petits variants d'ADN, les fusions d'ARN et les variants d'épissage d'ARN, y compris les variants CDx et de profilage tumoral. La définition des variants a été évaluée et elle répondait à tous les critères d'acceptation, indiquant que les tissus FFPE montés sur lame pour une utilisation avec le test TSO Comprehensive (EU) étaient stables à température ambiante jusqu'à 4 semaines (28 jours). Il est à noter qu'une diminution de 10 % du taux de validité du CQ de la bibliothèque MSI a été détectée après 4 semaines (28 jours) en raison d'une combinaison de temps d'opérateur et de stockage. Les fusions d'ARN et les variants d'épissage présentaient une diminution d'environ 29 % des lectures justificatives après conservation sur lames pendant 4 semaines (28 jours).

Bande de garde de titration d'entrée d'acide nucléique

L'apport en acide nucléique pour le test TSO Comprehensive (EU) a été évalué en testant l'ADN de 33 échantillons FFPE englobant 17 types de tissus, à des niveaux d'entrée allant de 10 ng à 500 ng, et en testant l'ARN de 5 échantillons FFPE de 5 types de tissus à des niveaux d'entrée allant de 10 ng à 85 ng. Les métriques de CQ de la bibliothèque ont été évaluées et étaient dépendantes de l'échantillon. Les résultats de l'ADN ont démontré que certaines métriques de CQ de l'échantillon d'ADN, mais pas toutes, répondent à une entrée accrue supérieure à l'entrée nominale de 40 ng :

- MEDIAN_INSERT_SIZE n'a pas répondu à une entrée supérieure à 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE a affiché une corrélation positive avec l'augmentation des données.
- PCT_EXON_50X a augmenté avec l'augmentation de l'entrée jusqu'à 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES a augmenté avec l'entrée croissante. Certains échantillons avec moins de 40 USABLE_MSI_SITES à 40 ng répondaient à la spécification à des entrées plus élevées, ce qui permettrait de calculer un score MSI.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET a augmenté avec l'entrée croissante.
- Augmenter l'entrée pour augmenter COVERAGE_MAD vers la limite de spécification supérieure.

Les métriques de CQ de l'échantillon d'ARN ont augmenté (MEDIAN_INSERT_SIZE et TOTAL_ON_TARGET_READS) ou diminué (MEDIAN_CV_GENE_500X) de 10 ng à 40 ng, mais en général, elles n'ont pas changé entre 40 ng et 85 ng.

Limite du blanc

Le pourcentage de faux positifs (sur le total des négatifs attendus) a été évalué par des tests répétés de tissu adjacent normal ou bénin FFPE qui ne doit pas contenir de variants somatiques pour les petits variants d'ADN, les amplifications de gènes, les MSI, les fusions d'ARN et les variants d'épissage d'ARN. Les faux positifs n'ont pas été analysés pour la TMB, car il n'y a pas de seuil clinique. Six échantillons FFPE d'ADN et 6 échantillons FFPE d'ARN ont été analysés en double avec 2 opérateurs sur 3 jours pour chacun des 2 lots de réactifs. Un sous-ensemble d'échantillons a été regroupé et reséquencé dans un format ADN 3x uniquement et un format ARN 3x uniquement pour évaluer les faux positifs avec plusieurs configurations multiplex prises en charge par ce dispositif. En outre, 30 échantillons d'ARN supplémentaires ont été analysés en double, traités avec 1 lot de réactifs, divisés entre 2 opérateurs. Au total, 168 observations possibles pour l'ADN et 228 observations pour l'ARN ont été réduites par des bibliothèques invalides pour chaque type de variant. Le pourcentage de faux positifs a été calculé au niveau du gène pour les amplifications et au niveau de la position (environ 1,9 million de positions) pour les petits variants d'ADN. Le pourcentage de faux positifs pour les types de variants de l'ADN est indiqué dans le Tableau 46. TSO Comprehensive (EU) n'a aucune allégation CDx (Niveau 1) pour les petits variants de l'ADN, de sorte qu'aucun faux positif pour les petits variants de l'ADN ne peut être signalé pour le Niveau 1. Les 271 faux positifs ont été mis à niveau par la base de TSO Comprehensive (EU) connaissances. Aucun faux positif n'était cliniquement significatif (niveau 2). Il y a eu 4 faux positifs au niveau 3 provenant de 2 variants sur 4 (2,4 %) observations sur les 168 observations. Le pourcentage de faux positifs pour les fusions d'ARN et les variants d'épissage était de 0 %, comme indiqué dans le Tableau 47.

Tableau 46 Faux positifs par type de variant d'ADN

Type de variant	Faux positifs
Amplifications génétiques	0 % (0/9912)
Petits variants d'ADN	0,0001 % (271/295 801 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	S.O.*

* Les faux positifs ne sont pas applicables car la TMB est rapportée comme un score et n'a pas de résultat qualitatif.

Tableau 47 Faux positifs par type de variant d'ARN

Type de variant	Faux positifs
Fusion	0 % (0/227)
Variant d'épissage	0 % (0/227)

Limite de détection

Deux études ont été menées pour évaluer les limites de détection pour TSO Comprehensive (EU). L'étude 1 a évalué les petits variants de l'ADN RET, les fusions RET et les fusions NTRK1–3. L'étude 2 a évalué d'autres variants du profilage tumoral.

Étude 1

Les limites de détection (LoD) des petits variants d'ADN NTRK1, NTRK3 et RET et des fusions NTRK1–3 et RET ont été déterminées. La LoD est la valeur d'analyte la plus basse (par exemple, fréquence des allèles variants ou lectures de support) qui peut être détectée de manière cohérente (limite de détection de 95 % ou erreur de type II de 5 %). Des tissus FFPE présentant de petits variants de l'ADN RET (cancer médullaire de la thyroïde), des fusions RET (cancer papillaire de la thyroïde, tumeur de spitz atypique) et des fusions NTRK1–3 (gliome de bas grade, glioblastome polymorphe, sarcome myofibroblastique, sarcome, cancer du sein sécrétoire, cancer du côlon), ainsi qu'une lignée cellulaire traitée par FFPE avec des petits variants de l'ADN NTRK1 et NTRK3 ont été utilisés dans l'étude. Chaque échantillon a été dilué à au moins 5 niveaux de test (allant d'environ 0,01 à 0,10 VAF pour les petits variants d'ADN et 2 à 25 lectures justificatives pour les fusions). Il y a eu 18 observations pour chaque niveau de test par lot et par variant générées par 3 opérateurs et 3 instruments de séquençage commençant la préparation de la bibliothèque sur 3 jours non consécutifs avec 2 réplicats de chaque niveau de test d'échantillon. Deux lots de réactifs ont été testés.

Pour les variants de l'ADN, les 2 lots ont été analysés indépendamment à l'aide d'une régression probit ou de l'approche du taux de réussite (niveau de test le plus bas avec un taux de réussite (estimation ponctuelle) ≥ 95 %) pour déterminer la LoD pour chaque variant par lot. La plus grande LoD entre les deux lots de réactifs a été prise comme limite de détection pour le variant (Tableau 48).

Pour les fusions d'ARN, des lignées cellulaires FFPE ont été utilisées pour estimer les valeurs de LoD pour chaque gène de fusion. Les LoD ont ensuite été vérifiées avec des tissus FFPE en utilisant des préparations de bibliothèque en double sur 3 opérateurs, 3 instruments et 3 lots de réactifs pour générer 54 observations par variant près de la LoD établie avec des lignées cellulaires FFPE. La limite de détection revendiquée pour chaque fusion (Tableau 49) est les lectures de support moyennes les plus basses ayant atteint un taux de réussite (estimation ponctuelle) ≥ 95 %.

Tableau 48 Limite de détection pour les petits variants d'ADN NTRK1, NTRK3 et RET

Marqueur	Chr[1]	Position	Référence	Alternative	Limite de détection (Fréquence allélique variable)
NTRK1 G595R (SNV)[2]	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV)[2]	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV)[2]	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV)[2]	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (délétion)[2]	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

[1] Chr = Chromosome
[2] Ces variants d'ADN ont été analysés par régression probit, les autres variants d'ADN ont été analysés par l'approche du taux de réussite.

Tableau 49 Limite de détection pour les fusions NTRK et RET

Gène	Fusion	Limite de détection (Lectures de soutien)
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

Gène	Fusion	Limite de détection (Lectures de soutien)
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Étude 2

Les limites de détection (LoD) des variants de profilage tumoral rapportés par TSO Comprehensive (EU) ont été évaluées. La LoD est la valeur d'analyte la plus basse (fréquence allélique variable, changement de facteur ou lectures de support) qui peut être détectée de manière cohérente (taux de réussite de 95 % ou erreur de type II de 5 %). Les échantillons FFPE de 17 types de tissus contenant des variants ont été dilués à plusieurs niveaux de test. Six observations ont été générées par niveau par deux opérateurs utilisant chacun un lot de réactifs et un instrument différents.

Variants de l'ADN

Les LoD de 10 petites classes de variants d'ADN (25 variants au total) et de 2 amplifications de gènes d'ADN (ERBB2 et MET) ont été déterminées et résumées sous forme de plages (Tableau 50). Les variants RET de la LoD de l'étude 1 sont également inclus. Deux des 3 insertions supérieures à 5 bp avaient une LoD de 0,034 et 0,036 VAF, la troisième ayant une LoD de 0,215 VAF. Cette dernière était une insertion dans une région de faible complexité où l'insertion ajoute des répétitions supplémentaires, a un impact sur l'alignement et nécessite plus de lectures pour une détection cohérente. Par conséquent, certains contextes génomiques de faible complexité pourraient avoir un impact sur la détection des insertions > 5 bp.

Tableau 50 Limite de détection pour les petits variants d'ADN et les amplifications de gènes

Type (unité de mesure pour la LoD)	Classe de variant / contexte génomique	Nombre de variants	Plage (VAF)
Petits variants de l'ADN (fréquence allélique variable)	SNV	5	0,016 à 0,064
	MNV	3	0,022 à 0,048
	Insertion (1 à 2 bp) près des répétitions de l'homopolymère	2	0,086 à 0,104
	Insertion (1 à 2 bp) près des répétitions du dinucléotide	2	0,038 à 0,051
	Insertion (3 à 5 bp)	2	0,030 à 0,056
	Insertion (> 5 bp et jusqu'à 25 bp)	3	0,034 à 0,215
	Délétion (1 à 2 bp) près des répétitions d'homopolymère	2	0,094 à 0,100
	Délétion (1 à 2 bp) près des répétitions du dinucléotide	2	0,033 à 0,070
	Délétion (3 à 5 bp)	2	0,028 à 0,064
	Délétion (> 5 et jusqu'à 25 bp)	2	0,047 à 0,055
Amplifications génétiques (changement de facteur)	Par gène (ERBB2, MET)	2	1,539 ; 1,570

L'analyse des variants non ciblés a été réalisée à partir d'échantillons de l'étude 1 ayant au moins cinq niveaux de test. Chaque variant non ciblé a été analysé individuellement et une LoD a été estimée uniquement pour les variants avec au moins un niveau > 0 % et un taux de réussite ≤ 95 %, et au moins un niveau ≥ 95 %. Le Tableau 51 présente les percentiles ainsi que les LoD minimales et maximales observées par classe pour les variants non ciblés. Les variants non ciblés fournissent plus de variants par classe que ceux testés dans l'Étude 2 et sont cohérents avec les plages de LoD du Tableau 50.

Tableau 51 Statistiques récapitulatives pour les limites de détection par classe de variants non ciblés (de l'étude 1)

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

Fusions

Les LoD ont été déterminées pour 19 fusions, représentant 20 gènes dans le panel TSO Comprehensive (EU), qui allaient de 9 à 31,3 lectures justificatives (Tableau 52). Trois gènes supplémentaires (NTRK1–3) ont été testés dans l'autre étude. Le gène RET a été testé ici et dans l'autre étude. Seize fusions avec des LoD déterminées avaient des données cohérentes avec une LoD commune de 16 lectures à l'appui utilisant une limite supérieure de confiance bilatérale (UCL) de 95 %. Deux fusions avaient des LoD de 24,7 et 31,3 lectures de support qui n'étaient pas cohérentes avec la LoD commune.

La fusion FGFR2-SRPK2 avec une valeur de LoD de 24,7 lectures à l'appui présentait des régions de chevauchement répétées dans le point de rupture, comme annoté par le logiciel du test TSO Comprehensive (EU). Les régions répétées au sein d'un point de rupture présentent généralement des niveaux de preuves inférieurs, car les lectures pourraient être cartographiées ailleurs dans le génome ou pourraient rester non alignées. En outre, les régions répétées rendent le processus d'assemblage (utilisé pour identifier les séquences de fusion) plus difficile et nécessitent des preuves supplémentaires pour construire la séquence correcte. SEPT14-EGFR est un autre exemple de fusion avec une séquence homologue dans le point de rupture.

La fusion BCL2-IGHJ5 avec une valeur de LoD de 31,3 lectures justificatives avait un gène très court (IGHJ5) avec le point d'arrêt proche du début d'un exon nécessitant des alignements courts écartés. Par conséquent, davantage de lectures étaient nécessaires pour une détection cohérente.

Tableau 52 Limite de détection pour les fusions

Fusion	Point de rupture du gène A	Point de rupture du gène B	LoD	LoD commune
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	oui
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	oui
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	oui
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	oui
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	oui
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	oui
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	oui

Fusion	Point de rupture du gène A	Point de rupture du gène B	LoD	LoD commune
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	oui
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	oui
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	oui
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	non
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	oui
CD74-ROS1 ;GOPC	149784243	117645578	9,2	oui
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	oui
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	oui
DHX8 ;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	oui
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	oui
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	non
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19.0	oui

Variants d’épissage

Les deux variants de l’épissage de l’ARN, MET et EGFR, présentaient des LoD de 18,7 et 16,7 lectures justificatives, respectivement.

Contenu de la tumeur

Les résultats de l’étude fournissent des recommandations pour le contenu tumoral des échantillons cliniques. En général, plus le contenu tumoral est important, plus le signal (VAF, changement de facteur ou lectures justificatives) est élevé pour les variants de la tumeur. Les recommandations de teneur minimale en tumeur sont basées sur les observations suivantes. Les valeurs de LoD pour les petits variants d’ADN ne sont pas supérieures à 0,104 VAF (à l’exception de l’insertion du TP53). Pour détecter les mutations pilotes dans la tumeur (fréquence des allèles variants de 0,50), une teneur tumorale de 20 % est recommandée, de sorte que ces mutations aient un VAF de 0,10 et soient égales ou supérieures à la LoD. À 20 % de contenu tumoral, les gènes amplifiés à un facteur de changement de 5,5 (11 copies), seraient constamment détectés sur la base d’une limite de détection de facteur de changement de 1,8. Avec une teneur tumorale de 20 %, les fusions avec 74 lectures à l’appui seraient constamment détectées sur la base d’une limite de détection de 14,7 lectures à l’appui.

Reproductibilité

Deux études ont été menées pour évaluer la reproductibilité du test TSO Comprehensive (EU). L'étude 1 a évalué les petits variants de l'ADN RET en plus des variants de fusion NTRK et RET. L'étude 2 a évalué d'autres variants de profilage tumoral.

Étude 1

Cette étude a été réalisée pour évaluer la reproductibilité du test TSO Comprehensive (EU) sur 3 sites de test (1 interne, 2 externe) avec 2 opérateurs par site, 2 réplicats en cours d'exécution et 3 jours de test non consécutifs. Les tests ont été réalisés avec un panel de reproductibilité comprenant des échantillons d'ADN contenant des petits variants d'ADN RET connus spécifiques et des échantillons d'ARN contenant des variants de fusion NTRK1–3 et RET connus spécifiques provenant d'échantillons de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) et de lignées cellulaires. Le panel contenait des membres du panel d'ADN et d'ARN avec de faibles niveaux de variants et des niveaux de variants élevés avec le même nombre de membres du panel de bas et de haut niveau pour chaque classe de variants. Les membres du panel de haut niveau étaient ciblés à environ 2 à 3 fois la LoD et les membres du panel de bas niveau étaient ciblés à environ la LoD. Sur chaque site, chaque opérateur a testé les membres du panel en double 3 fois, générant 6 observations par cible par membre du panel. Sur les 3 sites, 36 observations ont été générées par membre du panel (3 sites/instruments × 2 opérateurs × 2 réplicats intra-série × 3 jours de début).

Les PPC et les PNC pour les petits variants d'ADN ciblés et les variants de fusion d'ARN ciblés à un niveau élevé ont été déterminés comme critères d'évaluation principaux. Les PPC et les PNC pour les petits variants d'ADN ciblés et les variants de fusion d'ARN ciblés au niveau bas ont été calculés comme critères d'évaluation secondaires. Les intervalles de confiance à 95 % (IC) bilatéraux associés à tous les critères d'évaluation sont calculés à l'aide de la méthode de notation de Wilson. Des analyses primaires ont été effectuées pour estimer le PPC et le PNC (avec des IC à 95 %) dans les membres du panel de haut niveau ciblés en combinant les observations de test TSO Comprehensive (EU) pour une cible donnée dans un groupe de membres du panel représentant la classe de variants applicable (par exemple, les petits variants d'ADN et les fusions d'ARN) entre les sites/instruments, les opérateurs et les séries. Pour chaque variant ciblé, les observations de test TSO Comprehensive (EU) chez les autres membres du panel au niveau élevé ciblé pour le même type de variant mais ne contenant pas le même variant que celui déterminé par la règle de la majorité ont été combinées au PNC calculé. Les PPC et PNC globaux pour les membres du panel ciblé de bas niveau ont été déterminés de la même manière.

Petits variants d'ADN RET

Pour les membres du panel de petits variants d'ADN de haut niveau, le PPC global était de 100,0 % (207/207 ; IC à 95 % : 98,2 % à 100,0 %) (Tableau 53). Le PNC global pour les membres du panel de petits variants d'ADN de haut niveau était de 100,0 % (1 035/1 035 ; IC à 95 % : 99,6 % à 100,0 %) (Tableau 54). Pour les membres du panel de petits variants d'ADN ciblés de bas niveau, le PPC global pour les membres du panel de petits variants d'ADN ciblés de bas niveau était de 99,1 % (210/212 ; IC à 95 % : 96,6 % à 99,7 %), et le PNC global était de 100,0 % (1 026/1 026 ; IC à 95 % : 99,6 % à 100,0 %).

Tableau 53 PPC du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection de petits variants d'ADN RET chez les membres de panel ciblés de haut et bas niveau

Niveau de variant	Type de variant	Variant ciblé (nucléotide)	Variant ciblé (acide aminé)	N	VAF[1] moyen	PPC (%) (n/N)	IC à 95 %[2]
~2-3 x 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)
	Délétion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Tout petit ADN variants élevés	Tout petit ADN variants élevés	Tout petit ADN variants élevés	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)
	Délétion	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Insertion	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Tout petit ADN variants bas	Tout petit ADN variants bas	Tout petit ADN variants bas	212	N/A[1]	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

[1] Abréviations : S.O., sans objet ; VAF, fréquence des allèles variants.
[2] L'intervalle de confiance à 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Tableau 54 PNC du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection de petits variants d'ADN RET chez des membres de panel ciblés de haut et bas niveau

Niveau de variant	Type de variant	Variant ciblé (nucléotide)	Variant ciblé (acide aminé)	N[1]	PNC (%) (n/N)	IC à 95 %[2]
~2-3 x 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)
	Délétion	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insertion	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Tout petit ADN variants élevés	Tout petit ADN variants élevés	Tout petit ADN variants élevés	1 035	100,0 (1 035/1 035)	(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)
	Délétion	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insertion	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Tout petit ADN variants bas	Tout petit ADN variants bas	Tout petit ADN variants bas	1 026	100,0 (1 026/1 026)	(99,6, 100,0)

[1] Toutes les observations regroupées à partir des combinaisons de variables membres du panel pour lesquelles la définition majoritaire est négative (les variants ciblés présentant des fusions avec moins de 50 % de définitions positives).
[2] L'intervalle de confiance à 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Tableau 55 présente l'analyse des composantes de variance des fréquences alléliques de variants (VAF) sur les environ 36 observations pour chaque membre du panel. L'écart-type (SD) et le coefficient de variation en pourcentage (%CV ; total et pour chaque source) ont été calculés et présentés pour chaque petit variant d'ADN RET ciblé.

Tableau 55 Analyse des composants de la variance du VAF du test TSO Comprehensive (EU) dans les échantillons du panel de petits variants d'ADN ciblés

Niveau de variant	Type de variant	Variant ciblé (nucléotide)	Variant ciblé (Acides aminés)	N	VAF moyen	SD du site (% CV)	SD opérateur (% CV)	SD Jour (% CV)	SD Répliqué (% CV)	SD Total (% CV)
~2-3 x 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)
	Délétion	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)
	Insertion	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)
	Délétion	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)
	Insertion	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)

Fusions NTRK 1–3 et RET

Pour les membres du panel de fusion d'ARN de haut niveau, le PPC global était de 99,3 % (285/287 ; IC à 95 % : 97,5 % à 99,8 %) (Tableau 56). Le PPC était de 100 % pour chaque membre du panel de haut niveau, sauf pour le membre du panel BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36 ; IC à 95 % : 81,9 % à 98,5 %]). Le PNC global pour les membres du panel de fusion d'ARN de haut niveau était de 100,0 % (1 724/1 724 ; IC à 95 % : 99,8 % à 100,0 %) (Tableau 57). Pour les membres du panel de fusion de l'ARN ciblé de faible niveau, le PPC global était de 95,4 % (272/285 ; IC à 95 % : 92,3 %, 97,3 %), et le PNC global était de 100,0 % (1 851/1 851 ; IC à 95 % : 99,8 % à 100,0 %).

Tableau 56 PPC du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection des fusions NTRK et RET chez les membres de panel ciblés de haut et bas niveau

Niveau de variant	Fusion ciblée	N	Lectures de support moyennes	PPC (%) (n/N)	IC à 95 %*
~2-3 x 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)
	Toutes les fusions sont élevées	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)
	Toutes les fusions sont faibles	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* L'intervalle de confiance à 95 % bilatéral (IC) est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Tableau 57 PNC du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection des fusions NTRK et RET chez les membres de panel non ciblés de haut et bas niveau

Niveau de variant	Fusions ciblées	N[1]	PNC (%) (n/N)	IC 95 %[2]
~2-3 x 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)
	Toutes les fusions - Élevé	1 724	100,0 (1 724/1 724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Toutes les fusions - Faible	1 851	100,0 (1 851/1 851)	(99,8, 100,0)

[1] Toutes les observations regroupées à partir des combinaisons de variables membres du panel pour lesquelles la définition majoritaire est négative (les variants ciblés présentant des fusions avec moins de 50 % de définitions positives).
[2] L'intervalle de confiance à 95 % bilatéral (IC) est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Tableau 58 présente l'analyse des composantes de variance des lectures de soutien sur les environ 36 observations dans chaque fusion ciblée. L'ET et le % CV (total et pour chaque source) ont été calculés et présentés pour chaque fusion ciblée.

Tableau 58 Analyse des composants de la variance des lectures du test TSO Comprehensive (EU) chez les membres du panel de fusion d'ARN ciblé

Niveau de variant	Fusion	N	Lectures de support moyennes	SD du site (% CV)	SD opérateur (% CV)	SD Jour (% CV)	SD Répliqué (% CV)	SD Total (% CV)
~2-3 x 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)

Étude 2

Une deuxième étude a été réalisée pour évaluer la reproductibilité du test TSO Comprehensive (EU) sur 3 sites de test (2 externes et 1 interne), 2 opérateurs/instruments par site, 3 lots de réactifs uniques, 4 jours de test (non consécutifs) et 2 analyses de séquençage par bibliothèque d'échantillons.

Les tests ont été effectués à l'aide d'échantillons d'ADN et d'ARN extraits de 41 échantillons de tissu FFPE et d'une lignée cellulaire FFPE (avec 1 échantillon de tissu FFPE et la lignée cellulaire FFPE utilisées pour créer 2 échantillons de panel chacun). Les échantillons tissulaires comprenaient les types suivants : vessie, os, cerveau, sein, côlon, jéjunum, rein, foie, poumon, ovaire, prostate, peau, tissus mous, estomac, thyroïde et utérus. Au total, 44 membres du panel ont été testés, y compris des membres du panel d'ADN présentant de petits variants d'ADN (SNV, MNV, insertions et délétions), des amplifications génétiques, différents scores TMB, des scores MSI élevés et des membres du panel d'ARN présentant des fusions et des variants d'épissage. La plupart des membres du panel présentaient des variants cibles connus à des niveaux d'environ 2 à 3 fois la limite de détection spécifique aux variants (~2–3 × LoD).

La LoD est la concentration d'analyte où les résultats de test observés sont positifs (variant détecté par rapport au seuil de test TSO Comprehensive (EU)) ≥ 95 % du temps. Les taux moyens de variants observés ont été classés comme étant environ < 2 × LoD (taux de variants observés à < 1,5 × LoD), ~ 2–3 × LoD (taux de variants observés de 1,5 × LoD à 3,4 × LoD) et environ > 3 × LoD (taux de variants observés à > 3,4 × LoD).

Le PPC pour les petits variants d'ADN, les amplifications de gènes, les variants MSI-élevé (MSI-H) et les variants d'ARN ont été calculés en combinant les observations sur les analyses de séquençage et les sites. Les PNC ont été calculés de manière similaire pour les petits variants d'ADN, les amplifications génétiques et les variants d'ARN. Pour chaque variant ciblé connu, les observations du test TSO Comprehensive (EU) chez les membres du panel du même type de variant mais contenant d'autres variants, non dérivés du même échantillon source, ni répondant à la règle de majorité pour ce variant (< 50 % des définitions étaient positifs) ont été combinées entre les sites, les opérateurs/instruments, les jours, les lots de réactifs et les analyses de séquençage pour calculer le PNC. Les intervalles de confiance 95 % (IC) bilatéraux sont calculés à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Petits variants d'ADN

Tableau 59 présente les PPC pour les petits variants d'ADN ciblés. Les PPC allaient de 91,3 % pour un BRAF SNV à 100 % pour la majorité des petits variants d'ADN.

Tableau 59 PPC du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection de petits variants d'ADN chez les membres du panel ciblé combinés

Niveau de variant observé[1]	Type de variant	Variant ciblé (nucléotide)	Variant ciblé (acide aminé)	VAF[2] moyen	PPC (%) (n/N)	IC à 95 %[3]
~2-3 x LoD	DELETION	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2-3 x LoD	DELETION	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2-3 x LoD	INSERTION	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3 100,0)
~2-3 x LoD	INSERTION	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2 x LoD	INSERTION	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2-3 x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)

Niveau de variant observé[1]	Type de variant	Variant ciblé (nucléotide)	Variant ciblé (acide aminé)	VAF[2] moyen	PPC (%) (n/N)	IC à 95 %[3]
~2-3 x LoD	DELETION	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3 x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3 x LoD	DELETION	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3 x LoD	INSERTION	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3 x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3 x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3 x LoD	INSERTION	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3 x LoD	DELETION	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2 x LoD	INSERTION	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3 x LoD	INSERTION	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

[1] Niveau de variant calculé à partir de la fréquence moyenne observée des allèles variants.
[2] Fréquence moyenne des allèles variants calculée à partir des résultats de test observés.
[3] L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Les PNC étaient de 100 % pour les petits variants d'ADN.

Tableau 60 présente l'analyse des composantes de variance des résultats de la VAF pour chaque source de variation et variation totale chez tous les membres du panel présentant des variants ciblés de l'ADN de petite taille.

Tableau 60 Analyse des composants de la variance du VAF pour les petits variants d'ADN ciblés

Variant ciblé (nucléotide)	N	VAF moyen	SD du site (% CV)	SD opérateur (site) (% CV)	SD (centre, opérateur) Jour (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Exécuté (% CV)	SD Total (% 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)

Il y avait deux petits variants ciblés par l'ADN pour lesquels le nombre d'observations était trop faible pour qu'un modèle de composants de variance soit ajusté. Pour ces deux variants ciblés, les SD globaux étaient de 0,027 pour le variant chr1_27024001_C_CG et de 0,001 pour le variant chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Amplifications génétiques

Tableau 61 présente les PPC pour les amplifications de gènes ciblées. Les PPC étaient de 100,0 % pour MET et de 100,0 % pour ERBB2.

Tableau 61 PPC du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection des amplifications génétiques chez des membres de panel ciblés combinés

Niveau de variant observé[1]	Variant ciblé	Variation moyenne observée du facteur[2]	Pourcentage de définition positive (%)	IC à 95 %[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] Niveau de variant calculé à partir du facteur de variation moyen observé.
[2] Changement de facteur moyen calculé à partir des résultats de test observés.
[3] L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Les PNC étaient de 100 % pour les amplifications génétiques.

Tableau 62 montre l'analyse des composantes de variance des résultats de facteur de variation pour chaque source de variation et variation totale chez tous les membres du panel avec des amplifications génétiques ciblées.

Tableau 62 Analyse des composants de variance du facteur de changement pour les amplifications de gènes ciblés

Variant ciblé	N	Facteur multiplicatif moyen	SD du site (% CV)	SD opérateur (site) (% CV)	SD (centre, opérateur) Jour (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Exécuté (% CV)	SD Total (% 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

Tableau 63 montre les PPC pour les membres ciblés du panel MSI-Élevé. Les PPC étaient de 100 % pour les deux membres du panel MSI-Élevé.

Tableau 63 PPC du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection du statut MSI-Élevé chez les membres du panel ciblé combiné

Membre du panel	Score MSI moyen[1]	N	Pourcentage de définition positive (%)	IC 95 %[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)
Tous les membres		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

[1] Score MSI moyen observé calculé à partir des résultats de test observés.
[2] L'intervalle de confiance à 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Tableau 64 montre l'analyse des composantes de variance des résultats du score MSI pour chaque source de variation et variation totale chez tous les membres du panel ciblés pour le statut MSI-Élevé.

Tableau 64 Analyse des composantes de variance du score MSI pour les membres ciblés du panel MSI-élevé

Membre du panel	N	Score MSI moyen	SD du site (% CV)	SD opérateur (site) (% CV)	SD (centre, opérateur) Jour (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Exécuté (% CV)	SD Total (% 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

Afin d'évaluer la reproductibilité des scores TMB, une analyse quantitative du score a été réalisée chez les membres ciblés du panel TMB, qui représentaient une plage de scores TMB attendus. Tableau 65 montre l'analyse des composantes de variance des résultats du score TMB pour chaque source de variation et variation totale des membres du panel TMB. Les SD totaux du score TMB étaient de 1,0 (%CV = 13) pour un membre du panel (score TMB moyen = 7,6) et de 1,1 (%CV = 2) pour un autre membre du panel (score TMB moyen = 63,2).

Tableau 65 Analyse des composantes de variance du score TMB pour les membres ciblés du panel TMB

Membre du panel*	N	Score TMB moyen	SD du site (% CV)	SD opérateur (site) (% CV)	SD (centre, opérateur) Jour (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Exécuté (% CV)	SD Total (% 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)

* Il y avait 1 membre du panel TMB pour lequel le nombre d'observations était trop faible (N = 2) pour qu'un modèle de composants de variance soit installé. Pour ce membre du panel, le SD global était de 1,7.

Variants d'ARN

Tableau 66 montre les PPC pour les variants d'ARN ciblés. Les PPC allaient de 91,7 % pour le KIF5B-RET à 100 % pour la plupart des variants d'ARN.

Tableau 66 PPC du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection des variants d'ARN chez les membres du panel ciblé combinés

Niveau de variant observé[1]	Type de variant	Variant ciblé	Lectures de support moyennes[2]	PPC (%) (n/N)	IC à 95 %[3]
> 3 × LoD	Fusion	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	CD74-ROS1 ; GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3 x LoD	Fusion	DHX8 ; ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusion	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusion	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
< 2 x LoD	Fusion	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Fusion	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3 × LoD	Variant d'épissage	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3 x LoD	Variant d'épissage	Saut de l'exon 14 du MET	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

[1] Niveau de variant calculé à partir des lectures moyennes observées à l'appui.
[2] Lectures moyennes à l'appui calculées à partir des résultats de test observés.
[3] L'intervalle de confiance 95 % bilatéral est calculé à l'aide de la méthode de notation de Wilson.

Le PNC était de 100 % pour chaque variant d'ARN ciblé, à l'exception de la fusion FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60 % (984/988 ; IC à 95 % : 98,96 % à 99,84 %).

Tableau 67 montre l'analyse des composantes de variance des résultats de lecture à l'appui pour chaque source de variation et variation totale chez tous les membres du panel présentant des variants d'ARN ciblés.

Tableau 67 Analyse des composants de variance des lectures de support pour les variants d'ARN ciblés

Variant ciblé	N	Lectures de support moyennes	SD du site (% CV)	SD opérateur (site) (% CV)	SD (centre, opérateur) Jour (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Exécuté (% CV)	SD Total (% CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1 ; GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8 ; ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
Variant d'épissage de l'EGFR vIII	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Variant d'épissage saut de l'exon 14 du MET	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Précision au sein du laboratoire

Deux études ont été menées pour évaluer la précision au sein du laboratoire pour TSO Comprehensive (EU). L'étude 1 a évalué les fusions NTRK et RET, ainsi que les petits variants de l'ADN RET. L'étude 2 a évalué la TMB et la MSI.

Étude 1

La précision intra-laboratoire a été évaluée pour les fusions NTRK1–3 (gliome de bas grade, glioblastome polymorphe, sarcome myofibroblastique, cancer du sein sécrétoire), les fusions RET (cancer de la thyroïde et tissu cutané d'un cancer inconnu) et les petits variants ADN RET (cancer médullaire de la thyroïde) avec les tissus FFPE des cancers indiqués. Chaque échantillon a été testé à deux niveaux de variants : ~1 × LoD (faible

niveau de variant) et ~2–3 × LoD (niveau de variant élevé), sauf pour l'échantillon contenant le CCDC6-RET, qui n'a été testé qu'au niveau de variant faible. Chacun des échantillons à chaque niveau de test a été analysé en double dans chaque événement de préparation de bibliothèque sur trois (3) opérateurs. Chaque opérateur a commencé la préparation de la bibliothèque sur trois (3) jours de démarrage non consécutifs et séquencé sur trois (3) instruments NextSeq 550Dx désignés. Trois (3) lots de réactifs ont été testés, générant 54 observations par niveau. Certains niveaux avaient moins de 54 observations en raison de bibliothèques invalides.

Analyse qualitative

La concordance qualitative de la définition des variants a été évaluée séparément pour les deux niveaux de variants pour un variant donné à partir d'observations groupées sur toutes les variables (opérateurs, lots de réactifs, instruments, jours et réplicats). Le PPC et le PNC et l'intervalle de confiance bilatéral à 95 % (score de Wilson) associés sont résumés dans le Tableau 68 (petits variants de l'ADN) et le Tableau 69 (fusions d'ARN).

Au niveau de variant élevé (~2 à 3 × LoD), le test TSO Comprehensive (EU) a démontré 100 % pour PPC et PNC pour tous les variants testés.

Au niveau des variants bas (~1 × LoD), le PPC pour les petits variants d'ADN allait de 83,3 % à 98,1 %, et le PPC pour les fusions d'ARN allait de 90,7 % à 100 %. Pour les variants avec PPC < 95 %, les VAF moyens (RET C634Y et RET D898_E901del) ou les lectures de support (NCOA4-RET et BCAN-NTRK1) étaient inférieurs aux limites de détection respectives. Au niveau des variants bas, un PNC de 100 % a été obtenu pour tous les variants.

Tableau 68 Résultats qualitatifs pour le variant d'ADN ciblé

Niveau de variant	Variant	Type de variant	VAF moyen	PPC (%) (n/N) (IC à 95 %)	PNC (%) (n/N) (IC à 95 %)
~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	DELETION	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*	DELETION	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Niveau de variant	Variant	Type de variant	VAF moyen	PPC (%) (n/N) (IC à 95 %)	PNC (%) (n/N) (IC à 95 %)
~3× 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	DELETION	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*	DELETION	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Les modifications nucléotidiques sont répertoriées pour chaque variant dans la section Limite de détection, à l'exception de RET D631_L633delinsE, qui est le chromosome 10, position 43609940, référence ACGAGCT, alternative A.

Tableau 69 Résultats qualitatifs pour les fusions d'ARN ciblées

Niveau de variant	Fusion	Lectures de support moyennes	PPC (%) (n/N) (IC à 95 %)	PNC (%) (n/N) (IC à 95 %)
~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 (lignée cellulaire FFPE)	23,1	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	
	KANK1-NTRK3	13,5	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4 100,0)
	NCOA4-RET	13,3	90,7 (49/54) (80,1, 96,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	CCDC6-RET	18,7	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (échantillon 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (échantillon 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Niveau de variant	Fusion	Lectures de support moyennes	PPC (%) (n/N) (IC à 95 %)	PNC (%) (n/N) (IC à 95 %)
~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 (Ligne cellulaire FFPE)	28,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	
	KANK1-NTRK3	39,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	NCOA4-RET	24,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	CCDC6-RET	S.O.	Non testé	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (échantillon 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (échantillon 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Analyse quantitative

L'analyse des composants de variance de probabilité maximale restreinte (REML) a été effectuée pour évaluer la variation totale de la variable continue sous-jacente (VAF pour les petits variants d'ADN et les lectures justificatives pour les fusions d'ARN) et estimer les composants de précision [écart-type (ET), coefficient de variation (CV)] pour chaque source de variation [opérateurs, instruments, jours, lots de réactifs, résiduels et totaux]. Les résultats sont présentés dans le Tableau 70 pour les petits variants d'ADN et dans le Tableau 71 pour les fusions d'ARN.

La variation de la VAF a augmenté avec la moyenne attendue pour une proportion binomiale. La variation des lectures à l'appui a augmenté avec la moyenne comme prévu avec les données de comptage. Le composant résiduel a été le plus grand contributeur à la variance totale pour les petits variants d'ADN et les fusions d'ARN aux deux niveaux, ce qui confirme la conclusion que la détection de ces variants par TSO Comprehensive (EU) est robuste pour les opérateurs, les lots, les instruments et les jours.

Tableau 70 Résultats quantitatifs SD et CV pour les petits variants d'ADN ciblés

Niveau VAF	Variant	Type de variant	N tentatives valides	VAF moyen	SD opérateur (% CV)	SD Instrument (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Jour (% CV)	SD résiduelle (% CV)	SD Total (% CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELETION	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	DELETION	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× LoD	RET D898_E901del	DELETION	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	DELETION	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)

Tableau 71 Résultats quantitatifs SD et CV pour les fusions d'ARN ciblées

Niveau de lecture de support	Fusion	N tentatives valides	Lectures de support moyennes	SD opérateur (% CV)	SD Instrument (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Jour (% CV)	SD résiduelle (% CV)	SD Total (% CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (lignée cellulaire)	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 (Échantillon 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (Échantillon 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Niveau de lecture de support	Fusion	N tentatives valides	Lectures de support moyennes	SD opérateur (% CV)	SD Instrument (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Jour (% CV)	SD résiduelle (% CV)	SD Total (% CV)
2-3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (lignée cellulaire)	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 (Échantillon 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (Échantillon 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Étude 2

La précision intra-laboratoire a été évaluée pour la TMB et la MSI. Cinq échantillons d'ADN FFPE pour le CPNPC pour la TMB et sept échantillons FFPE pour le CCR pour la MSI, y compris les MS-Stable et les MSI-Élevés, ont été utilisés pour évaluer la précision à différents niveaux sur l'ensemble de la plage de scores. Chacun des échantillons a été analysé en double sur trois (3) opérateurs, trois (3) jours, avec trois (3) préparations de bibliothèque pour trois (3) lots de réactifs utilisant trois instruments NextSeq 550Dx générant 54 observations par niveau.

La concordance qualitative a été évaluée pour le statut MSI. Le test TSO Comprehensive (EU) a démontré une concordance de 100 % pour le pourcentage de définitions positif et le pourcentage de définitions négatif pour le statut MSI. Pour la TMB, le test TSO Comprehensive (EU) rapporte un score TMB, la concordance qualitative n'est pas applicable.

La variation totale des scores TMB et MSI, ainsi que la contribution par source (instruments, opérateurs, lots, jours et résiduels), ont été quantifiées à l'aide d'un modèle de composantes de variance sur une plage de scores. L'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) sont présentés dans le Tableau 72 pour la TMB et dans le Tableau 73 pour la MSI par niveau. Certains niveaux avaient moins de 54 observations en raison de bibliothèques invalides.

Tableau 72 Résultats SD et CV du score TMB quantitatif

Niveau	Score TMB moyen	N tentatives valides	SD opérateur (% CV)	SD Instrument (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Jour (% CV)	SD résiduelle (% CV)	SD total (% 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)

Tableau 73 Résultats SD et CV du score MSI quantitatif

Statut MSI	Niveau	Score MSI moyen (%)	N tentatives valides	SD opérateur (% CV)	SD Instrument (% CV)	Lot SD (% CV)	SD Jour (% CV)	SD résiduelle (% CV)	SD total (% CV)
MS-Stable	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-Élevé	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)

La variation des scores TMB a tendance à augmenter avec la moyenne attendue des distributions théoriques des données de comptage. La variation des scores MSI pour les niveaux proches du score MSI = 50 est supérieure à la variation des scores MSI plus proches de 0, ou 100, ce qui correspond à la variabilité des distributions théoriques des données de proportion. La composante résiduelle est restée le plus grand contributeur à la variance totale pour les scores MSI et TMB, ce qui confirme la conclusion que les scores sont solides pour les opérateurs, les lots, les instruments et les jours. Cependant, les MSI et TMB sont des biomarqueurs complexes, les performances analytiques pourraient varier d'un échantillon à l'autre. Autrement dit, la variation de la TMB dépend non seulement de la valeur de la TMB, mais également de la composition des variants dans l'échantillon, tels que le type de variant (SNV, Indel) et le taux de VAF (proche du seuil d'inclusion). De même, la variation MSI dépend non seulement de la valeur MSI, mais également de la composition des sites de l'échantillon, comme le nombre de sites instables et la quantité d'instabilité par site.

Les valeurs C5 et C95 autour du seuil de 20,00 % ont été déterminées pour la MSI à l'aide d'un profil de précision (Tableau 74).

Tableau 74 Intervalle C5-C95 pour MSI

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

L'impact du contenu tumoral sur les scores TMB et MSI a été évalué. Pour la plupart des échantillons, une teneur tumorale ≥ 30 % a eu un impact négligeable sur les scores TMB supérieurs à environ 10 mutations par mégabase. Les scores TMB sont restés relativement inchangés avec l'augmentation du contenu tumoral. Pour les échantillons présentant une MSI-Élevée, le contenu tumoral présentait une corrélation linéaire positive avec le score MSI. Les échantillons présentant une MSI-Élevée sont restés MSI-Élevés en moyenne lorsque la teneur tumorale était ≥ 30 %. Les échantillons endométriaux se sont comportés différemment des autres types de tissus et il s'est avéré qu'une plus grande quantité de contenu tumoral était définie MSI-Élevée.

Précision pour le profilage tumoral

La détection des variants par le test TSO Comprehensive (EU) a été comparée aux résultats des méthodes de référence. Les petits variants de l'ADN et le TMB ont été comparés à une méthode NGS validée externe pour l'exome entier. Les amplifications génétiques ont été comparées à la même méthode NGS d'exome entier ou à la méthode validée d'hybridation in situ double (DISH) pour les amplifications HER2. La MSI a été évaluée par

rapport à un test MSI-PCR validé. Les variants d'épissage de l'ARN ont été comparés à une méthode PCR quantitative validée (qPCR). Les fusions ROS1 et ALK ont été comparées aux tests FISH validés. Toutes les autres fusions ont été comparées à une méthode composite composée d'un test NGS de l'exome entier de l'ARN (RNGS1) validé, d'un panel NGS ciblé (RNGS2) et d'une PCR numérique à gouttelettes (ddPCR).

Détection des petits variants de l'ADN

La détection de petits variants d'ADN par le test TSO Comprehensive (EU) a été comparée aux résultats du séquençage de l'exome entier (WES) qui utilise le WES avec des paires d'échantillons normaux de tumeur appariées pour la désignation des petits variants germinaux et somatiques. La comparaison entre les petits variants, constitués de variants nucléotidiques uniques (SNV), d'insertions et de délétions, était basée sur 124 échantillons provenant de 14 types de tissus différents qui étaient valides pour TSO Comprehensive (EU) et le WES. TSO Comprehensive (EU) peut détecter des variants multinucléotidiques (MNV, 2–3 bp) qui nécessitent un phasage, mais pas le test WES. TSO Comprehensive (EU) Les MNV ont été évalués en tant que SNV individuels par rapport au WES. Un résumé de la concordance au niveau des variants, y compris le pourcentage de concordance positive (PPA) et le pourcentage de concordance négative (NPA) pour toutes les définitions de variants, est présenté dans le Tableau 75.

Tableau 75 Résumé de concordance pour les définitions de petits variants évalués par statut germinatif ou somatique

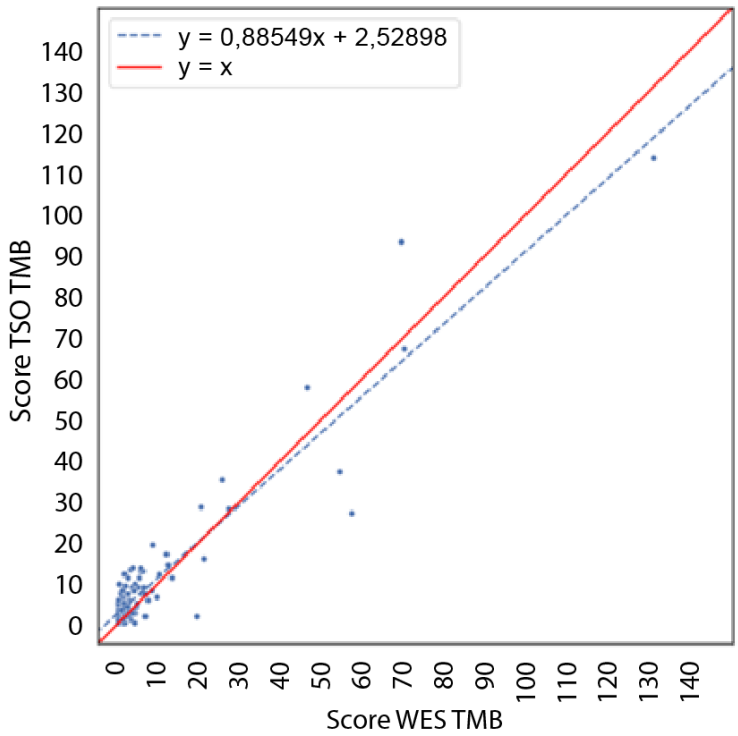
	WES Somatic défini	WES Germline défini	WES non défini
TSO Comprehensive (EU) défini	382	33 163	426
TSO Comprehensive (EU) non défini	69	61	70 000 481
Total	451	33 224	70 000 907
Pourcentage de concordance	PPA : 85 % (382/451), IC à 95 % : [81 %, 87 %]	PPA : > 99 % (33 163/33 224) IC à 95 % : [99,8 %, 99,9 %]	NPA : > 99 % (70 000 481/70 000 907) IC à 95 % : [99,999 %, 99,999 %]

Au total, TSO Comprehensive (EU) a défini 426 variants qui n'ont pas été détectés dans la méthode WES. Deux cent quatre (48 %) de ces variants avaient des fréquences d'allèles variants inférieures au seuil de définition dans la méthode WES. Parmi les variants faux positifs potentiels restants, il y avait des preuves de la définition de variants dans la méthode WES avec un faible soutien. De plus, de nombreux variants présentaient des preuves WES de très faible niveau dans les échantillons normaux appariés. Ce résultat suggère que ces variants ont été manqués dans la tumeur par le WES en raison d'une contamination normale de la tumeur.

Détection de la charge mutationnelle tumorale

La concordance de la TMB a été déterminée en comparant les scores de TMB (mutations somatiques/mégabase) entre la méthode WES et TSO Comprehensive (EU) pour 124 échantillons avec des données disponibles par TSO Comprehensive (EU) et WES. L'analyse de régression linéaire avec le WES comme facteur prédictif avait une intersection y de 2,53, une pente de 0,89 et un coefficient de corrélation de Pearson de 0,94 (Figure 3).

Figure 3 Corrélation du score TMB entre WES et TSO Comprehensive (EU)



Détection d'amplifications génétiques

La détection des amplifications génétiques par le test TSO Comprehensive (EU) a été comparée aux résultats du même test WES en utilisant soit des échantillons tumoraux appariés normaux, soit des échantillons tumoraux uniquement. Au total, il y avait 420 échantillons, dont 183 ont utilisé la méthode de la tumeur orthogonale normale et 237 ont utilisé la méthode de la tumeur uniquement. Sur les 420 échantillons, 50 ont été sélectionnés pour l'étude parce qu'ils étaient positifs à l'amplification avec TSO Comprehensive (EU) ou un test antérieur. La performance de ces échantillons caractérisés a été ajustée en utilisant une prévalence moyenne de fusion. Les performances combinées des échantillons caractérisés et non caractérisés utilisaient une moyenne pondérée en variance inverse. Les échantillons provenaient de 14 types de tissus et contenaient des amplifications provenant de 55 gènes. TSO Comprehensive (EU) rapporte des amplifications génétiques provenant des gènes MET et ERBB2. Cependant, la précision a été évaluée pour les 55 gènes. Un résumé des définitions d'amplification génétique est présenté dans le Tableau 76.

Tableau 76 Résumé de la concordance pour les amplifications génétiques

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

* Intervalle de confiance calculé par bootstrap.

Les amplifications de l'ERBB2 (HER2) dans les tissus gastriques et mammaires ont été analysées séparément des autres amplifications génétiques à l'aide d'une méthode d'hybridation in situ double (DISH). Au total, 116 échantillons mammaires et gastriques, dont 64 précédemment caractérisés comme HER2 positifs par IHC ou FISH, ont été testés. Un échantillon a échoué dans l'extraction, 4 échantillons ont échoué à la validité pour TSO Comprehensive (EU), et 3 échantillons ont échoué à la validité pour le test DISH. Sur les 108 échantillons, 20 (18,5 %) présentaient des scores limites (entre 1,5 et 2,5) proches du seuil DISH de 2,0. Les résultats de concordance, y compris PPA, NPA pour tous les échantillons et à l'exclusion des cas limites de HER2 DISH, sont présentés dans le Tableau 77.

Tableau 77 Résumé de la concordance entre TSO Comprehensive et HER2 DISH, y compris pour l'amplification du gène HER2

Amplification du gène HER2 Tous (mammaire et gastrique)	HER2 DISH amplifié	HER2 DISH non amplifié
TSO Comprehensive (EU) Positif	17 (dont 1 limite)	13 (dont 1 limite)
TSO Comprehensive (EU) Négatif	10 (dont 6 limites)	68 (dont 12 limites)
Pourcentage de concordance incluant les cas limites	PPA : 63 % (17/27) IC à 95 % : [44 %, 78 %]	NPA : 84 % (68/81) IC à 95 % : [74 %, 90 %]
Pourcentage de concordance hors cas limites	PPA : 80 % (16/20) IC à 95 % : [58 %, 92 %]	NPA : 82 % (56/68) IC à 95 % : [72 %, 90 %]

Détection de l'instabilité des microsatellites

La détection de l'instabilité des microsatellites par le test TSO Comprehensive (EU) a été comparée aux résultats d'un test MSI-PCR validé qui utilise des échantillons appariés normaux de la tumeur pour le test. Au total, 195 échantillons, répondant à l'exigence de contenu tumoral ≥ 30 % (pour l'état MS-Stable) et représentant 14 types de tissus, ont été comparés. Le test MSI-PCR évalue 5 sites et présente 3 résultats : MSI Stable (aucun site instable), MSI-Faible (un site instable) et MSI-Élevé (MSI-H) (deux sites instables ou plus). TSO Comprehensive (EU) évalue jusqu'à 130 sites de microsatellites et classe uniquement les échantillons comme MS-Stable ou MSI-Élevé (≥ 20 % de sites instables). Les résultats MSI-Faible ont été regroupés avec les résultats MS-Stable pour la MSI-PCR. L'analyse de concordance est présentée dans le Tableau 78.

Tableau 78 Résumé de l'analyse de concordance entre TSO Comprehensive (EU) et MSI-PCR pour l'instabilité des microsatellites de l'ADN

Statut MSI	PCR MSI-Élevé	PCR MSI-Faible	PCR MSI-Stable
TSO Comprehensive (EU) Instable (MSI-Élevé)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stable (MS-Stable)	3	0	150
Total	44	2	150
Pourcentage de concordance	PPA : 93 % (41/44) IC à 95 % : [82 %, 98 %]	NPA : 99 % (150/152) IC à 95 % : [95 %, > 99 %]	

Détection des variants d'épissage d'ARN

La précision pour la détection des variants d'épissage a été calculée en comparant les résultats TSO Comprehensive (EU) aux tests qPCR pour EGFRvIII et saut de l'exon 14 du MET, y compris un ARN positif connu pour chacun des variants d'épissage. Une analyse de concordance a été réalisée sur un total de 230 échantillons uniques d'ARN FFPE provenant de 14 types de tissus, avec des données disponibles par TSO Comprehensive (EU) et la méthode de référence. Tous les échantillons ont été testés pour le saut de l'exon 14 du MET, tandis que l'EGFRvIII a été testé uniquement dans le tissu cérébral, respectivement. Trois échantillons définis positifs pour le saut de l'exon 14 du MET par qPCR mais pas par TSO Comprehensive (EU) avaient un Ct moyen > 37 et étaient inférieurs au niveau de la LoD TSO Comprehensive (EU). Tableau 79 résume les résultats de l'étude de concordance.

Tableau 79 Résumé de l'analyse de concordance entre TSO Comprehensive (EU) et le test qPCR pour les variants d'épissage de l'ARN

Variants d'épissage d'ARN	qPCR positif	qPCR négatif
TSO Comprehensive (EU) positif (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) négatif (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) positif (Saut de l'exon 14 du MET)	1	0
TSO Comprehensive (EU) négatif (Saut de l'exon 14 du MET)	3	217
Total	7	230
Pourcentage de concordance	PPA : 57 % (4/7) IC à 95 % : [25 %, 84 %]	NPA : 100 % (230/230) IC à 95 % : [98 %, 100 %)

Détection de fusion d'ARN

Comparaison avec une méthode composite

Les fusions TSO Comprehensive (EU) ont été comparées à une méthode composite composée d'un séquençage de l'exome entier d'ARN à l'aide d'un panel NGS (RNGS1), d'un panel de fusion NGS ciblé (RNGS2) et d'une PCR numérique à gouttelettes (ddPCR).

La méthode RNGS1 se chevauche avec tous les gènes pour lesquels TSO Comprehensive (EU) peut détecter des fusions. Cependant, la limite de détection de la méthode RNGS1 était 4X–8X celle de TSO Comprehensive (EU) en fonction du nombre de lectures justificatives prises en charge observées dans les définitions de fusion qui se chevauchaient. Par conséquent, une méthode composite utilisant deux méthodes supplémentaires avec une plus grande sensibilité, mais moins d'étendue pour les fusions, a été utilisée avec la méthode WES (RNGS1).

Au total, 255 échantillons d'ARN uniques représentant 14 types de tissus et de passage d'indicateurs TSO Comprehensive (EU) ont été testés avec le RNGS1. Deux échantillons n'étaient pas valides pour le CQ des échantillons RNGS1 et ont été exclus de l'analyse supplémentaire. Sur les 82 fusions définies par TSO Comprehensive (EU), 4 ont été exclues de l'évaluation en raison d'échecs du CQ de l'échantillon RNGS1, et 7 fusions supplémentaires n'étaient pas définissables en raison de l'absence des cibles dans le panel RNGS1. Sur les 71 fusions restantes définies par TSO Comprehensive (EU), RNGS1 a confirmé 9 fusions. RNGS1 a défini 4 fusions non définies par TSO Comprehensive (EU).

Sur les 62 fusions positives TSO Comprehensive (EU) et non détectées par RNGS1, 13 se chevauchaient et étaient confirmées par RNGS2. Une fusion a été définie par RNGS2, mais pas par TSO Comprehensive (EU).

La PCR numérique des gouttelettes a ensuite été utilisée pour les fusions définies par TSO Comprehensive (EU), non définies ou non définissables par RNGS1, et non évaluables par RNGS2 (49). En outre, la ddPCR a été utilisée pour la réévaluation de 2 des 4 fusions faussement négatives au TSO Comprehensive (EU) avec RNGS1 et de 2 des 9 fusions concordantes au TSO Comprehensive (EU) et au RNGS1. Cinq échantillons de fusion négatifs ont été inclus dans le test de chaque échantillon de fusion positif afin de garantir la spécificité. Dix-huit fusions n'ont pas été testées avec la ddPCR en raison de l'incapacité à concevoir des primers/sonde, de multiples partenaires génétiques pour la fusion ou d'un matériel FFPE restant insuffisant. Pour la ddPCR, les primers et les sondes ont été conçues par rapport aux concentrations critiques observées dans le test TSO Comprehensive (EU).

Au total, 52 fusions ont été détectées par ddPCR, 41 de ces fusions ont été définies par TSO Comprehensive (EU), mais non définies ou non définissables par RNGS1. Neuf fusions ont été définies par ddPCR, mais négatives au TSO Comprehensive (EU) ou au RNGS1. Deux fusions positives au test ddPCR ont confirmé les 2 fusions concordantes au TSO Comprehensive (EU) et au RNGS1. Aucune fusion n'a été détectée par ddPCR pour les 2 faux négatifs TSO Comprehensive (EU) réévalués avec RNGS1. Cependant, ceux-ci ont été comptabilisés comme faux négatifs sur la base de la comparaison RNGS1.

Sur les 255 échantillons, 35 ont été sélectionnés pour l'étude parce qu'ils étaient positifs à la fusion avec TSO Comprehensive (EU) ou un test antérieur. La performance de ces échantillons caractérisés a été ajustée en

utilisant une prévalence moyenne de fusion. Les performances combinées des échantillons caractérisés et non caractérisés utilisaient une moyenne pondérée en variance inverse. Les résultats de concordance composites pour les fusions sont présentées dans le Tableau 80.

Les 66 fusions (54 fusions uniques) concordant avec la méthode composite représentaient 43 gènes dans le panel TSO Comprehensive (EU). Cependant, les fusions peuvent être rapportées uniquement à partir des 23 gènes indiqués dans le Tableau 80.

Tableau 80 Résumé de la concordance pour les fusions d'ARN

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

* Intervalle de confiance calculé par bootstrap.

Comparaison avec la méthode FISH pour les fusions ROS1 et ALK

Vingt-cinq échantillons de CPNPC ont été testés par FISH pour les fusions ROS1 et ALK et 5 échantillons supplémentaires de CPNPC ont été testés pour les fusions ROS1, respectivement. Huit échantillons n'ont pas répondu à l'analyse FISH pour ROS1 en raison d'un tissu inadéquat. Deux fusions ROS1 et une fusion ALK ont été détectées à la fois par TSO Comprehensive (EU) et par FISH. Aucun résultat discordant n'a été observé. Tableau 81 résume les résultats de concordance de TSO Comprehensive (EU) et de la méthode FISH et pour les fusions ROS1 et ALK.

Tableau 81 Résumé des résultats de concordance de TSO Comprehensive (EU) et de la méthode FISH et pour les fusions ROS1 et ALK

ALK+ROS1	FISH positif	FISH négatif
TSO Comprehensive (EU) Positif	3	0
TSO Comprehensive (EU) Négatif	0	44
Total	3	44
Pourcentage de concordance	PPA : 100 % (3/3) IC à 95 % : [44 %, 100 %]	NPA : 100 % (44/44) IC à 95 % : [92 %, 100 %]

Validité de l'échantillon

La validité de l'échantillon (première tentative) a été mesurée pour 181 échantillons uniques d'ARN et 272 échantillons uniques d'ADN provenant de blocs FFPE âgés de ≤ 5 ans. Ces échantillons ont été sélectionnés en fonction du type de tissu et du matériel disponible. La validité du test était inconnue. Les métriques de CQ de la bibliothèque doivent réussir pour que le type de variant soit considéré comme valide. La validité des échantillons a été évaluée séparément pour chacun des types de variants (petits variants d'ADN/TMB, MSI, amplifications génétiques, fusions/variants d'épissage) et est présentée dans le Tableau 82. Une diminution supplémentaire de la validité des MSI de 1 % pour les blocs FFPE âgés de ≤ 2 ans en raison de l'expédition des réactifs est prévue.

Tableau 82 Validité de l'échantillon

Type de variant	Validité de l'échantillon
Variants de fusions/épissages (ARN)	76 %
Petits variants d'ADN/TMB	75 %
MSI	72 %
Amplification génétique	94 %

Résumé de la validation analytique pour les revendications de profilage tumoral

Sur la base des données de limite de détection, de précision, de reproductibilité et de précision, TSO Comprehensive (EU) est validé analytiquement pour les éléments suivants :

- Petits variants de l'ADN : SNV, MNV, insertions et délétions.
- TMB
- MSI
- Amplifications des gènes MET et ERBB2 (HER2) (consulter le Tableau 2).
- 23 gènes pour lesquels des fusions peuvent être détectées (consulter le Tableau 2).
- Variants d'épissage de l'EGFR et du MET (consulter le Tableau 2).

Performances cliniques du NTRK

Pour valider le test TSO Comprehensive (EU) en tant que diagnostic compagnon (CDx) pour la sélection des patients pour le traitement par VITRAKVI (larotrectinib), des échantillons provenant de patients inclus dans les essais cliniques sur le larotrectinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, collectivement définis échantillons de l'essai sur le larotrectinib) à l'aide d'une date limite de recueil des données du 15 juillet 2019, complétés par des échantillons de tissu FFPE d'origine commerciale, ont été testés pour soutenir une TSO Comprehensive (EU) étude de précision du test et une étude de transition clinique.

L'étude NCT02122913 était une étude de phase 1, multicentrique, en ouvert, à dose progressive, menée auprès de patients adultes atteints de tumeurs solides avancées (tous venus) non sélectionnés pour un cancer positif à la fusion NTRK. Suite à la partie d'escalade de dose de l'étude, une expansion de la dose a été initiée pour les patients atteints d'un cancer positif à la fusion du gène NTRK documenté et pour les patients dont l'investigateur pensait qu'ils pourraient bénéficier d'un inhibiteur hautement sélectif du gène TRK. NAVIGATE NCT02576431 est une étude panier de phase 2, multicentrique, en ouvert, en cours, menée auprès de patients âgés de 12 ans et plus atteints de tumeurs solides avancées récurrentes avec une fusion NTRK documentée, évaluée par un laboratoire externe. SCOUT NCT02637687 est une étude de phase 1/2 en cours, multicentrique, en ouvert, menée chez des patients pédiatriques âgés de la naissance à 21 ans atteints de tumeurs avancées solides ou primaires du système nerveux central (SNC).

Parmi les patients positifs à la fusion NTRK inclus dans l'étude de test TSO Comprehensive (EU), 164 ont formé l'ensemble principal d'efficacité étendue du larotrectinib (ePAS4).

Étude de précision pour la détection de fusion NTRK1, NTRK2, NTRK3

La précision du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection des fusions NTRK (NTRK1, NTRK2 ou NTRK3) chez les patients atteints de tumeurs solides a été démontrée en évaluant la concordance des résultats de fusion NTRK entre le test TSO Comprehensive (EU) et une méthode orthogonale validée basée sur le NGS.

Une étude rétrospective non interventionnelle a été menée. Les échantillons de l'essai sur le larotrectinib et les échantillons supplémentaires ont été testés avec le test TSO Comprehensive (EU) sur un site externe et avec une méthode orthogonale dans un laboratoire central. La précision des définitions de fusion NTRK du test TSO Comprehensive (EU) a été estimée par rapport à la méthode orthogonale ; le pourcentage de concordance positive (PPA), le pourcentage de concordance négative (NPA) et les intervalles de confiance (IC) bilatéraux à 95 % associés ont été calculés.

516 échantillons ont été testés avec le test TSO Comprehensive (EU) et/ou la méthode orthogonale. Parmi ces échantillons, 499 ont été testés par les deux méthodes. Dix-sept des 516 échantillons n'ont pas été testés avec l'un des tests en raison d'un échec de l'extraction, d'une raison inconnue (pour la méthode orthogonale) ou d'un écart au protocole. Sur les 499 échantillons testés par les deux méthodes, 170 (34,1 %) étaient des échantillons de l'essai sur le larotrectinib et 329 (65,9 %) étaient des échantillons supplémentaires.

Un tableau croisé des résultats pour les 499 échantillons est présenté dans le Tableau 83. Sur les 499 échantillons, 85 avaient des résultats de test TSO Comprehensive (EU) invalides ; sur ces 85, 53 avaient également des résultats de méthode orthogonale invalides. Sept échantillons supplémentaires présentaient des résultats de méthode orthogonale invalides. Ainsi, 407 des 499 échantillons avaient des résultats valides par les deux méthodes.

Tableau 83 Étude de précision NTRK : tabulation croisée du résultat TSO Comprehensive (EU) par rapport au résultat de la méthode orthogonale pour la détection de fusion NTRK

	Résultat de la méthode orthogonale			
Résultat du test TSO Comprehensive (EU)	**NTRK Fusion positif**	**NTRK Fusion négatif**	**Invalide**	**Total**
NTRK Fusion positif	114	16	1	131
NTRK Fusion négatif	4	273	6	283
Invalides*	4	28	53	85
Total	122	317	60	499

*TSO Comprehensive (EU) les résultats de test invalides proviennent de l'échantillon et du niveau de l'analyse.

Les analyses de concordance, excluant et incluant les résultats de test TSO Comprehensive (EU) invalides, sont présentées dans le Tableau 84. À l'exclusion des résultats de test TSO Comprehensive (EU) invalides, le PPA était de 96,6 % (114/118 ; IC à 95 % : 91,5 % à 99,1 %) et le NPA était de 94,5 % (273/289 ; IC à 95 % : 91,2 % à 96,8 %).

Tableau 84 Étude de précision NTRK : PPA et NPA du test TSO Comprehensive (EU) par rapport au résultat de la méthode orthogonale pour la détection des fusions NTRK

	Exclure les résultats de test TSO Comprehensive (EU) invalides		Y compris les résultats de test TSO Comprehensive (EU) invalides	
Mesure de concordance	**Concordance, % (n/N)**	**IC à 95 %***	**Concordance, % (n/N)**	**IC à 95 %***
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

* IC à 95 % basé sur la méthode (exacte) de Clopper-Pearson.

Étude clinique de transition pour la détection de fusion NTRK1, NTRK2, NTRK3

La validité clinique du test TSO Comprehensive (EU) pour la détection des fusions NTRK1, NTRK2 ou NTRK3 chez les patients atteints de tumeurs solides qui pourraient bénéficier d'un traitement par larotrectinib a été démontrée dans une étude clinique de transition. L'étude a été menée pour évaluer l'efficacité clinique du test TSO Comprehensive (EU) afin d'identifier les patients positifs à la fusion NTRK1, NTRK2 ou NTRK3 pour le traitement par larotrectinib, et pour évaluer la concordance entre le test TSO Comprehensive (EU) et les méthodes de test local (LT) (utilisées pour déterminer le statut de fusion NTRK pour les essais cliniques sur le larotrectinib).

Les méthodes LT comprenaient les tests NGS, d'hybridation in situ fluorescente (FISH), de réaction en chaîne par polymérase (PCR) et NanoString. Les fusions NTRK (ETV6 NTRK3) ont été déduites pour les patients atteints de fibrosarcome infantile qui présentaient une translocation ETV6 documentée identifiée par FISH. La plupart des 235 patients de l'essai sur le larotrectinib ayant un statut de fusion NTRK connu avaient été testés par des méthodes NGS.

À la date limite de collecte des données du 15 juillet 2019, 279 patients étaient inclus. Sur les 279 patients, 208 étaient positifs à la fusion NTRK. Sur les 208 patients positifs, 164 ont formé l'ePAS4 du larotrectinib.

Le critère d'évaluation principal pour l'analyse de l'efficacité du larotrectinib était le taux de réponse globale (TRG) selon l'évaluation du comité d'examen indépendant (CEI) dans un ensemble de données groupées provenant des trois études cliniques. Le TRO a été évalué en fonction de la proportion de patients présentant la meilleure réponse globale de réponse complète confirmée ou de réponse partielle confirmée selon les critères RECIST, version 1.1. Le TRO dans l'ePAS4 du larotrectinib était de 72,6 % (IC à 95 % [65,1 %, 79,2 %]) et incluait des patients présentant 16 types de tumeurs différents.

Comptabilité des échantillons

L'ensemble d'échantillons comprenait la représentation d'un large éventail de types de tumeurs et d'échantillons de patients pédiatriques et adultes.

279 patients ont été inclus dans les études sur le larotrectinib au 15 juillet 2019. Parmi ceux-ci, 235 patients avaient un statut de fusion NTRK connu, tel que déterminé par une méthode LT : 208 étaient positifs et 27 étaient négatifs. Pour 44 patients, le statut de fusion NTRK n'était pas connu, car des tests n'étaient pas

nécessaires pour l'éligibilité des patients dans les phases d'escalade de dose des études NCT02122913 et SCOUT NCT02637687. Pour l'étude de transition clinique du test TSO Comprehensive (EU), les échantillons de patients de l'essai sur le larotrectinib inclus au 15 juillet 2019 avec un statut de fusion NTRK connu (208 patients positifs et 27 patients négatifs) et les échantillons supplémentaires déterminés comme étant négatifs à la fusion NTRK par des méthodes représentatives de LT étaient éligibles pour cette étude.

Sur les 208 échantillons positifs de l'essai sur le larotrectinib, 154 avaient un échantillon disponible pour les tests TSO Comprehensive (EU). Parmi eux, 138 avaient des résultats valides. Quinze échantillons n'étaient pas valides en raison d'un échec des métriques de qualité du séquençage des échantillons et 1 échantillon n'a pas été testé en raison d'une déviation au protocole. Sur les 27 échantillons négatifs de l'essai sur le larotrectinib, 24 avaient un échantillon disponible pour analyse. Parmi eux, 22 avaient des résultats de test TSO Comprehensive (EU) valides. Deux échantillons n'étaient pas valides en raison d'un échec des métriques de qualité du séquençage des échantillons.

Des échantillons supplémentaires ont été sélectionnés à l'aide de l'une des deux méthodes représentatives de LT. Plus de 350 échantillons ont été obtenus et examinés pour vérifier la teneur en tumeur. Parmi les échantillons supplémentaires répondant aux exigences d'échantillon, 266 ont été extraits avec succès et confirmés comme étant négatifs à la fusion NTRK par une méthode représentative LT. Parmi ces échantillons, 260 étaient disponibles pour les tests TSO Comprehensive (EU), dont 222 avaient des résultats valides. 38 échantillons n'étaient pas valides en raison d'un échec des métriques de séquençage des échantillons (n = 25) ou d'un échec du séquençage de l'analyse (n = 13). L'ensemble négatif pour la fusion NTRK total comprenait 222 échantillons supplémentaires et 22 échantillons de l'essai sur le larotrectinib.

Résultats de concordance

Dans l'ensemble, 437 échantillons ont été testés par TSO Comprehensive (EU). Parmi les 208 patients positifs à la fusion NTRK, 153 avaient des échantillons disponibles qui ont été testés par TSO Comprehensive (EU), ce qui a donné 138 résultats valides et 15 résultats non valides.

La concordance des résultats TSO Comprehensive (EU) relatifs aux méthodes LT, avec et sans les résultats TSO Comprehensive (EU) invalides, est présentée dans le Tableau 85.

Tableau 85 Étude de transition clinique NTRK : concordance entre les méthodes de test TSO Comprehensive (EU) et LT pour la détection des fusions NTRK

	À l'exclusion des résultats de test TSO Comprehensive (EU) invalides		Y compris les résultats de test TSO Comprehensive (EU) invalides	
Mesure de concordance	**% de concordance (n/N)**	**IC à 95 %***	**% de concordance (n/N)**	**IC à 95 %***
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

* Les IC bilatéraux à 95 % ont été calculés à l'aide de la méthode (exacte) de Clopper-Pearson.

L'analyse de sensibilité par rapport aux résultats de test TSO Comprehensive (EU) manquants a démontré la robustesse de l'analyse de concordance. Les résultats de test TSO Comprehensive (EU) manquants pour les patients positifs à la fusion LT NTRK (n = 70) ont été imputés à l'aide d'un modèle de régression logistique. Les estimations de concordance, y compris les valeurs imputées, sont présentées dans le Tableau 86.

Tableau 86 Étude de transition clinique NTRK : concordance entre les méthodes de test TSO Comprehensive (EU) et LT pour la détection des fusions NTRK, y compris les valeurs imputées pour les patients LT positifs avec des résultats de test TSO Comprehensive (EU) manquants

Mesure de concordance	% de concordance	IC à 95 %*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Les résultats de test TSO Comprehensive (EU) manquants pour les patients négatifs à la fusion LT n'ont pas été imputés.
* Les IC bilatéraux à 95 % ont été calculés sur la base de la méthode d'imputation multiple de Boot. La méthode d'imputation multiple Boot est une étape bootstrap imbriquée dans l'imputation multiple (Schomaker et Heumann 2018).

Les concordances entre le test TSO Comprehensive (EU) et les LT par type de méthode (par exemple, NGS ARN, FISH) sont présentées dans le Tableau 87.

Tableau 87 Étude de transition clinique NTRK : concordance entre les méthodes de test TSO Comprehensive (EU) et LT pour la détection des fusions NTRK par type de méthode LT

Type de méthode LT	Mesure de concordance	% de concordance (n/N)	CI 95 %[1]
ADN 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)
ARN 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	Non calculé (1/1)	Non calculé
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Non calculé (0/0)	Non calculé
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Non calculé : pour les sous-groupes avec un nombre d'échantillons < 5, les statistiques de concordance n'ont pas été calculées.
[1] Les IC bilatéraux à 95 % ont été calculés à l'aide de la méthode (exacte) de Clopper-Pearson.

[2] Inclut les méthodes NGS qui utilisent uniquement l'ARN et à la fois l'ADN et l'ARN.

Sur les 437 échantillons testés avec le test TSO Comprehensive (EU), 24 avaient des résultats discordants avec les LT : 15 étaient positifs par les LT et négatifs par le test TSO Comprehensive (EU) et 9 étaient négatifs par les LT et positifs par le test TSO Comprehensive (EU). Sur les 24 échantillons présentant des résultats discordants, 8 ont été testés avec une méthode ADN NGS LT, 14 avec une méthode ARN NGS LT et 2 avec FISH.

Une méthode NGS indépendante validée a confirmé les résultats du test TSO Comprehensive (EU) dans 14 des 24 échantillons avec des résultats discordants. Pour les 10 échantillons restants, les résultats du test TSO Comprehensive (EU) étaient discordants avec la méthode LT et la méthode NGS indépendante.

Résultats d'efficacité clinique

Dans la cohorte ePAS4, l'efficacité du larotrectinib dans la population TSO Comprehensive (EU) positive, LT positive (97 patients, TRO = 78,4 %, IC à 95 % [68,8 %, 86,1 %]) était similaire à l'efficacité du larotrectinib dans la population totale ePAS4 (164 patients, TRO = 72,6 %, IC à 95 % [65,1 %, 79,2 %]) (Tableau 88). Sur les 97 patients TSO Comprehensive (EU) positifs dans l'ePAS4, 28 (28,9 %) patients ont obtenu une réponse complète/réponse complète chirurgicale et 48 (49,5 %) patients ont obtenu une réponse partielle.

Sur les 13 patients TSO Comprehensive (EU) négatifs, positifs pour la LT, 1 (7,7 %) a présenté une réponse complète et 2 (15,4 %) une réponse partielle avec le traitement par larotrectinib.

Tableau 88 Étude de transition clinique NTRK : TRO pour les patients LT positifs par LT et résultats TSO Comprehensive (EU) dans l'ePAS4

		Fusion LT positive N = 164	TSO Comprehensive (EU) positif et LT positif N = 97	TSO Comprehensive (EU) négatif et LT positif N = 13
Meilleure réponse globale, n (%)	Réponse complète	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Réponse complète chirurgicale	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Réponse partielle	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Maladie stable	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Maladie évolutive	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Non évaluable	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Taux de réponse globale	Nombre de patients, n	164	97	13
	Nombre de patients avec RC + RCC + RP, n	119	76	3
	% ORR (IC à 95 %*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Abréviations : RC = réponse complète, RP = réponse partielle, RCC = réponse complète chirurgicale.
* L'intervalle de confiance bilatéral à 95 % a été calculé à l'aide de la méthode (exacte) de Clopper-Pearson.

54 patients ont des résultats de test TSO Comprehensive (EU) manquants.

Les données de cette étude appuient la sécurité d'emploi et l'efficacité du test TSO Comprehensive (EU) lorsqu'il est utilisé pour identifier les patients atteints de tumeurs solides avec fusions NTRK qui pourraient être éligibles au traitement par larotrectinib.

Références

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Consulté le 3 octobre 2016.
2. Société européenne d’oncologie médicale. www.esmo.org. Consulté le 3 octobre 2016.

Historique des modifications

Révision	Date	Description de la modification
Document n° 200007789 v08	Mai 2025	Suppression de la référence aux versions logicielles et aux références. Mise à jour des limites de la procédure : • Informations sur le tissu nécrotique. • Informations sur le contenu de la tumeur MSI. Mise à jour : • Note de bas de page NTC à appliquer aux bibliothèques min et max. • Les équipements et les matériaux répertorient les spécifications de la centrifugeuse à plaques et les incréments de pipette. • Calcul du surplus de SPB de 1,05x à 1,15x. • Terminologie pour la délétion de l'exon 14 du MET au saut de l'exon 14 du MET. Ajout : • Remarque pour SMB dans Capture Targets One et Two. • Préparer l'introduction du séquençage. • Informations supplémentaires sur l'appareil à ultrasons. Ajout de clarifications et de résultats mis à jour pour les caractéristiques de performance : • Substances interférentes. • Précision pour le profilage tumoral et la validité de l'échantillon. • Limite de détection Étude 1 et 2. • Précision au sein du laboratoire Étude 1. • Étude de reproductibilité 2. • Stabilité de la bibliothèque et informations sur le stockage de la bibliothèque. • Limite du blanc. Mise à jour de la langue et de la grammaire.

Révision	Date	Description de la modification

Document n°200007789 v07	Janvier 2024	• Ajout d'informations aux limites de la procédure :
		  • Exigences en matière d'échantillon de tissu nécrotique et de contenu tumoral pour les mutations du facteur somatique et à MSI-élevée.
		  • Interférence potentielle de l'hémoglobine.
		  • Limites de détection dans le gène RET et définition de fusion en dehors des limites génétiques annotées.
		  • Les délétions génétiques ne sont pas rapportées.
		• Mise à jour pour utilisation avec le logiciel TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager version 2.3.7.
		• Ajout d'informations sur l'équipement et le matériel requis mais non fournis, dont deux configurations supplémentaires d'appareils à ultrasons.
		• Mise à jour des informations sur les échantillons :
		  • Teneur en tissu nécrotique.
		  • Effets de la protéinase K et de l'hémoglobine.
		  • Stockage de FFPE monté sur lame et d'acide nucléique purifié.
		• Ajout d'informations pour améliorer la manipulation des réactifs, le flux de travail et la résolution des échecs de CQ.
		• Ajout du contexte et d'éclaircissements aux caractéristiques de performance :
		  • Contamination croisée
		  • Évaluation de la trousse d'extraction d'acide nucléique
		  • Substances interférentes
		  • Stabilité de l'acide nucléique et du FFPE monté sur lame
		  • Performances cliniques du NTRK
		• Mise à jour de la langue et de la grammaire

Document n°200007789 v06	Février 2023	• Déclarations supplémentaires dans la section Limitations • Mises à jour linguistiques pour la convention, la grammaire et la clarté • Correction des tableaux 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Déclaration sur la présence de précipités dans le réactif FSM • Mise à jour des spécifications du thermocycleur et du creux dans la liste Équipements et matériaux

Révision	Date	Description de la modification
Document n°200007789 v05	Septembre 2022	Mise à jour des tableaux de reproductibilité de l'étude 2
Document n° 200007789 v04	Juin 2022	• Ajout du module d'analyse TSO Comprehensive v2.3.5 PN • Suppression du module d'analyse TSO Comprehensive v2.3.3 PN • Mise à jour de la terminologie dans la section Limite de blanc
Document n° 200007789 v03	Avril 2022	• Ajout d'informations sur les caractéristiques de performance liées aux fusions NTRK • Ajout de la mention POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT • Mise à jour de la déclaration d'utilisation prévue pour ajouter la revendication NTRK1-3 CDx • Informations étendues sur les composants du produit pour inclure les NP des composants logiciels
Document n°200007789 v02	Février 2022	• Correction de l'erreur de référence du tableau • Ajout d'une limitation liée aux variants germinaux et somatiques • Clarification du langage concernant la détection de l'amplification génétique
Document n° 200007789 v01	Décembre 2021	• Mise à jour des limites de la procédure • Clarification des spécifications du support magnétique et du thermocycleur dans les listes des équipements et des matériaux
Document n° 200007789 v00	Novembre 2021	Publication initiale

Brevets et Marques

Ce document et son contenu sont la propriété exclusive d'Illumina, Inc. et ses filiales (« Illumina »), et sont destinés à un usage contractuel de ses clients en lien avec l'utilisation du ou des produits décrits dans la présente et à aucune autre utilisation. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin et/ou ne seront communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Par le biais de ce document, Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de son copyright ou de ses droits au titre du droit commun ni des droits similaires d'un tiers quelconque.

Les instructions présentes dans ce document doivent être strictement et explicitement respectées par le personnel qualifié et correctement formé afin d'assurer une utilisation correcte et sécuritaire du ou des produits décrits dans la présente. Tout le contenu de ce document doit être entièrement lu et compris avant d'utiliser le ou les produits.

LE FAIT DE NE PAS LIRE ENTIÈREMENT ET DE NE PAS SUIVRE EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LA PRÉSENTE PEUT CAUSER DES DOMMAGES AU OU AUX PRODUITS, DES BLESSURES AUX PERSONNES, Y COMPRIS AUX UTILISATEURS OU À D'AUTRES PERSONNES, ET DES DOMMAGES À D'AUTRES BIENS, ET ANNULERA TOUTE GARANTIE APPLICABLE AU OU AUX PRODUITS.

ILLUMINA N'ASSUME AUCUNE RESPONSABILITÉ QUANT AUX DOMMAGES DÉCOULANT D'UNE MAUVAISE UTILISATION DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LA PRÉSENTE (Y COMPRIS LES PARTIES DE CELLE-CI OU LE LOGICIEL).

© 2025 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs propriétaires respectifs. Pour en savoir plus sur les marques, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

Coordonnées

Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+(1) 800 809 ILMN (4566)
+(1) 858 202 4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

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

Étiquette du produit

Pour obtenir des informations détaillées sur les symboles susceptibles d'apparaître sur l'emballage et l'étiquette du produit, consultez la légende des symboles pour votre trousse sur l'onglet *Documentation* à l'adresse support.illumina.com.

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT.
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT.