TruSight Oncology Comprehensive (UE)

illumina®

Inserto della confezione

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. SOLO PER L'ESPORTAZIONE.

Uso previsto

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) è un test diagnostico *in vitro* che utilizza un sequenziamento di nuova generazione mirato per rilevare le varianti in 517 geni utilizzando acidi nucleici estratti da campioni di tessuto tumorale fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) da pazienti affetti da neoplasie maligne solide utilizzando lo strumento Illumina® NextSeq™ 550Dx. Il test può essere utilizzato per rilevare varianti di singolo nucleotide, varianti di multipli nucleotidi, inserzioni, delezioni e amplificazioni geniche dal DNA e fusioni geniche e varianti di splicing dall'RNA. Il test calcola anche un punteggio per il carico mutazionale del tumore (TMB) e per lo stato di instabilità microsatellitare (MSI).

Il test è stato ideato come diagnostica di accompagnamento per identificare i pazienti affetti da cancro per il trattamento con la terapia mirata elencata nella Tabella 1, in conformità con l'etichettatura del prodotto terapeutico approvato. Inoltre, il test è mirato a fornire informazioni sul profilo tumorale che gli operatori sanitari qualificati possono utilizzare in conformità alle linee guida professionali e non è conclusivo né prescrittivo per l'uso previsto dall'etichetta di qualsiasi prodotto terapeutico specifico.

Tabella 1 Indicazioni per la diagnostica di accompagnamento

Tipo di tumore	Biomarcatori	Terapia mirata
Tumori solidi	Fusioni geniche NTRK1, NTRK2 e NTRK3	VITRAKVI® (larotrectinib)

Riepilogo e descrizione del saggio

Descrizione clinica

Il tumore è una delle principali cause di decesso in tutto il mondo e può avere origine in qualsiasi tessuto.[1, 2] L'analisi della base genetica di un tumore è importante per identificare i pazienti che possono beneficiare di terapie target e per sviluppare nuovi metodi di trattamento. È stato rilevato che sono diversi i geni implicati nella causa o nella progressione del tumore, e molti tumori recano una varietà di varianti che riguardano questi geni e le loro funzioni. Queste varianti possono includere mutazioni geniche come le varianti di singolo nucleotide (SNV), le varianti di multipli nucleotidi (MNV), le inserzioni o le delezioni, le amplificazioni geniche, le fusioni geniche e le varianti di splicing. Un'altra conseguenza delle mutazioni genetiche tumorali è la presentazione di neoantigeni che possono suscitare risposte immunitarie specifiche per il tumore. Lo stato mutazionale di un tumore può essere rappresentato dal carico mutazionale del tumore (TMB) e dall'instabilità microsatellitare (MSI), che sono firme genomiche associate all'instabilità genomica e alla presentazione di neoantigeni tumorali.

TruSight Oncology Comprehensive è un test qualitativo per la mappatura genomica completa (CGP) che utilizza il sequenziamento di nuova generazione (NGS) per valutare ampiamente le varianti genomiche su un ampio pannello di geni correlati al tumore elencati nella Tabella 2. Il saggio rileva varianti piccole in 517 geni, oltre ad amplificazioni geniche, fusioni e varianti di splicing come indicato nella Tabella 2. Il saggio garantisce la copertura delle sequenze codificanti per tutti i geni, fatta eccezione per TERT, per il quale è coperta solo la regione del promotore e valuta il punteggio TMB e lo stato MSI. Gli obiettivi del saggio includono contenuti citati da organizzazioni professionali e altre importanti linee guida statunitensi. Anche le pubblicazioni indipendenti dei consorzi e le ricerche farmaceutiche più recenti hanno influenzato il design del saggio TSO Comprehensive.

Per un elenco delle regioni escluse dalle identificazioni di varianti, consultare *Elenco di blocco di TruSight Oncology Comprehensive (documento n. 200009524)* disponibile sul sito di supporto Illumina.

Nella Tabella 2 sono identificate quattro categorie di tipi di varianti: variante piccola del DNA (S), amplificazione genica (A), fusione (F) e variante di splicing (Sp). Le varianti piccole di DNA includono SNV, MNV, inserzioni e delezioni.

Tabella 2 Pannello genetico del saggio TSO Comprehensive (UE)

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

N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante	N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante	N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S

N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante	N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante	N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1.026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S

N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante	N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante	N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2.072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S

N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante	N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante	N.	ID Entrez	Gene	Tipo di variante
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	N/D	NA	NA	N/D
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	N/D	NA	NA	N/D
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	N/D	NA	NA	N/D
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	N/D	NA	NA	N/D
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	N/D	NA	NA	N/D
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	N/D	NA	NA	N/D
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	N/D	NA	NA	N/D
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	N/D	NA	NA	N/D

Principi della procedura

Il saggio TSO Comprehensive (UE) è un test distribuito eseguito manualmente utilizzando l'acido nucleico estratto come materiale di input. Il DNA e/o l'RNA estratto da tessuti in formalina e inclusi in paraffina (FFPE) vengono utilizzati per preparare librerie arricchite per i geni correlati al tumore da sequenziare su strumento NextSeq 550Dx.

Il saggio TSO Comprehensive (UE) include i seguenti processi.

- **Preparazione e arricchimento delle librerie**: per l'RNA 40 ng in totale vengono convertiti in DNA complementare a doppio filamento (cDNA). Per il DNA genomico (gDNA), 40 ng di gDNA vengono divisi in piccoli frammenti. Gli adattatori universali per il sequenziamento vengono legati sui frammenti di cDNA e gDNA. Durante il sequenziamento, le sequenze di adattatori P5 e P7 vengono incorporate in ogni libreria per consentire la cattura dei frammenti di libreria sulla superficie della cella a flusso. Gli adattatori includono gli indici di sequenza i5 e i7 per identificare ciascun singolo campione e, nel caso di librerie ottenute da campioni di gDNA, ciascuna singola molecola con l'utilizzo di identificatori molecolari univoci (UMI). Le librerie vengono quindi arricchite per i geni specifici di interesse utilizzando un metodo basato sulla cattura. Le sequenze di sonde biotinilate che coprono le regioni geniche di interesse, che rappresentano il target del saggio, vengono ibridate sulla base delle librerie. Le sonde e le librerie ibridate target vengono isolate dalle librerie non target mediante cattura con particelle magnetiche di streptavidina. Le librerie target arricchite vengono lavate e amplificate. La quantità di ogni libreria arricchita viene poi normalizzata, utilizzando un metodo basato su microsfere, per garantire una rappresentazione uguale nelle librerie raggruppate per il sequenziamento.
- **Sequenziamento e analisi primaria**: le librerie normalizzate e arricchite vengono raggruppate in pool e clusterizzate su una cella a flusso e poi sequenziate utilizzando la chimica di sequenziamento mediante sintesi (SBS) in NextSeq 550Dx. La chimica SBS utilizza un metodo terminatore reversibile per rilevare singole basi deossinucleotidiche trifosfato (dNTP) marcate in modo fluorescente mentre vengono incorporate nei filamenti di DNA in estensione. Durante ciascun ciclo di sequenziamento, un singolo dNTP viene aggiunto alla catena di acido nucleico. La marcatura dNTP serve come terminatore per la polimerizzazione. Dopo ogni incorporazione di dNTP, il colorante fluorescente viene sottoposto a imaging per identificare la base, e poi scisso per permettere l'incorporazione del nucleotide successivo. Quattro dNTP reversibili legati al terminatore (A, G, T e C) sono presenti come molecole singole e distinte. Di conseguenza, la competizione naturale riduce al minimo le distorsioni dovute all'incorporazione. Durante l'analisi primaria, le identificazioni delle basi vengono effettuate direttamente dalle misurazioni dell'intensità del segnale durante ogni ciclo di sequenziamento, con conseguente sequenziamento base -per- base. A ogni identificazione delle basi viene assegnato un punteggio qualitativo.
- **Analisi secondaria**: Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module risiede nello strumento NextSeq 550Dx nell'ambito del software Local Run Manager; il suo scopo è facilitare la configurazione della corsa TSO Comprehensive (UE) ed eseguire l'analisi secondaria dei risultati del sequenziamento. L'analisi secondaria include la convalida dell'elaborazione della corsa e il controllo qualità, seguito da demultiplex, generazione di file FASTQ, allineamento e identificazione delle varianti. Il demultiplex separa i dati dalle librerie raggruppate in pool sulla base degli indici di sequenza unici aggiunti durante la procedura di preparazione delle librerie. Vengono generati file intermedi FASTQ che contengono le letture di sequenziamento per ogni campione e i punteggi qualitativi ed escludono le letture provenienti da cluster che non hanno attraversato il filtro. Le letture di sequenziamento vengono poi allineate con un genoma di riferimento per identificare una relazione tra le sequenze e assegnare un punteggio basato sulle regioni di somiglianza. Le letture allineate vengono scritte su file in formato BAM. Il software del saggio utilizza algoritmi separati per le librerie generate da campioni di DNA e/o RNA per identificare varianti piccole di DNA, amplificazioni geniche, TMB e MSI per i campioni di DNA e fusioni e varianti di splicing per i

campioni di RNA. Il modulo del software di analisi genera diversi output, tra cui metriche di sequenziamento e file VCF (Variant Call Format). I file VCF contengono informazioni sulle varianti trovate in posizioni specifiche in un genoma di riferimento. Per ogni campione vengono generati metriche di sequenziamento e singoli file di output. Consultare la *Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661)* per i dettagli sull'analisi secondaria e terziaria.

- **Analisi terziaria**: l'analisi terziaria, eseguita da Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module, è composta dai calcoli TMB e MSI, dall'identificazione mediante diagnostica di accompagnamento, dal profilo tumorale delle varianti in due livelli di significato clinico utilizzando una Knowledge Base (KB) e il tipo di tessuto e dalla creazione di report dei risultati. Il profilo del tumore può anche essere chiamato mappatura genomica completa. I risultati delle varianti interpretate, così come i risultati dei biomarcatori TMB e MSI, sono riepilogati nel report dei risultati TSO Comprehensive (UE).

Limiti della procedura

Solo per uso diagnostico *in vitro*.

- Solo su prescrizione medica. Il test deve essere utilizzato in base alle norme del laboratorio clinico.
- I risultati genomici elencati nella Tabella 2 relativi all'uso previsto non sono conclusivi né prescrittivi per l'uso previsto dall'etichetta di qualsiasi prodotto terapeutico specifico.
- Per le varianti elencate nel report dei risultati TSO Comprehensive (UE) in Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance, Level 2 (Risultati genomici con evidenza di significato clinico, Livello 2) e Genomic Findings with Potential Clinical Significance, Level 3 (Risultati genomici con potenziale significato clinico, Livello 3), non è stata eseguita la convalida clinica.
- Le decisioni sulla cura e sul trattamento dei pazienti deve basarsi su un giudizio medico indipendente da parte del medico curante, prendendo in considerazione tutte le informazioni applicabili relative alla condizione del paziente, come anamnesi del paziente e della famiglia, esame obiettivo, informazioni su altri test diagnostici e preferenze del paziente, in base agli standard di cura di una data comunità.
- La qualità dei campioni in FFPE sono di qualità variabile. I campioni che non sono stati sottoposti a procedure di fissazione standard potrebbero non generare acidi nucleici estratti che soddisfino i requisiti di controllo qualità del saggio (*Controllo qualità* alla pagina 83). I blocchetti in FFPE conservati per più di cinque anni hanno dimostrato una validità inferiore.
- Le prestazioni di TSO Comprehensive (UE) in campioni ottenuti da pazienti che sono stati sottoposti a trapianti di organo o tessuto non sono state valutate.
- Quantità elevate di tessuto necrotico (≥23%) può interferire con la capacità del saggio TSO Comprehensive (UE) di rilevare le amplificazioni geniche e le fusioni di RNA.
- Il rilevamento delle mutazioni somatiche driver potrebbe non essere affidabile se il contenuto tumorale (per area) fosse inferiore al 20%.

- Un risultato di stabilità microsatellitare (MS-Stable) può essere inaffidabile se il contenuto del tumore è inferiore al 30%. Un risultato di microsatellite elevato (MSI-High) è corretto a prescindere dal contenuto tumorale.
- L'emoglobina associata al tessuto diminuisce le letture di supporto per le varianti di splicing di MET.
- In genomi altamente riarrangiati con delezioni e perdita di eterozigosità, il software TSO Comprehensive (UE) può erroneamente classificare un campione di DNA come contaminato (CONTAMINATION_SCORE > 3.106 e un valore p > 0,049).
- Un risultato negativo non esclude la presenza di una mutazione al di sotto del limite di rilevamento (LoD, Limits of Detection) del saggio.
- Quanto segue può influire sulla sensibilità del rilevamento di varianti piccole di DNA:
  - Contenuto genomico di bassa complessità
  - Incremento della lunghezza della variante
- I punteggi TMB possono risultare inaccurati per i contenuti seguenti:
  - Il contenuto di tumore raggiunge livelli in cui le frequenze alleliche delle varianti (VAF) della linea germinale e somatica convergono.
  - In popolazioni non ben rappresentate nei database pubblici.
- Le amplificazioni geniche sono le uniche varianti del numero di copie riportate da TSO Comprehensive (UE). Le delezioni geniche non sono riportate dal saggio.
- Gli algoritmi di identificazione della fusione nel software del saggio TSO Comprehensive (UE) potrebbero non prendere in considerazione l'evidenza delle letture che si estendono al di fuori dei limiti del gene annotato.
- Quanto segue può influire sulla sensibilità del rilevamento di fusioni:
  - La complessità bassa delle librerie risultante in un minor numero di letture di supporto a causa di deviazioni nel flusso di lavoro del saggio (ad esempio, attenersi alle fasi di miscelatura contenute in *Denaturazione e appaiamento dell'RNA* alla pagina 45).
  - Quando un singolo gene copre entrambi i breakpoint.
  - Nei casi in cui diversi breakpoint di fusione si trovano gli uni accanto agli altri con uno o più partner; i diversi breakpoint e partner potrebbero essere riportati come un singolo breakpoint e partner.
  - Con inserti mediani di piccole dimensioni. È richiesta una dimensione minima dell'inserto mediano di 80 bp, ma la sensibilità diminuisce nell'intervallo 80-100 bp.
  - La complessità bassa della sequenza o contenuto genomico omologo intorno ai breakpoint della fusione.
- Quando i breakpoint della fusione si verificano nelle regioni genomiche contenenti geni sovrapposti, questo può influire sulla risoluzione dei geni coinvolti in una fusione. Il saggio riporterà tutti i geni, delimitati da punti e virgola, se più geni sono sovrapposti a un breakpoint.
- Una copertura incoerente nella regione del promotore TERT può generare un No Result (Nessun risultato) a causa della profondità bassa.

- Errori di annotazione o della KB possono fornire un risultato falso positivo o falso negativo, incluso l'elencare una variante in un livello errato (tra Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance - Level 2 [Risultati genomici con evidenza di significato clinico - Livello 2] e Genomic Findings with Potential Clinical Significance - Level 3 [Risultati genomici con potenziale significato clinico - Livello 3]) o le informazioni sull'annotazione nel report potrebbero essere errate. Gli errori di annotazione o KB non influiscono sulle varianti riportate nei risultati CDx. La possibilità di generare un errore deriva da tre fonti:
  - Annotazione delle varianti TSO Comprehensive (UE). Esiste un tasso di errore di circa lo 0,0027%, in base a un'analisi di 2.448.350 varianti da COSMIC v92, pertanto la possibilità di errore è bassa.
  - Errore della KB dovuto al processo di selezione.
  - La rilevanza del contenuto della KB cambia nel tempo. Il report rifletterà le conoscenze al momento in cui la versione della KB è stata curata.
- TSO Comprehensive (UE) è progettato per riportare le varianti somatiche durante il rilevamento delle varianti con evidenza di significato clinico o varianti con potenziale significato clinico. Come test solo per il tumore, il report delle varianti della linea germinale (ereditaria) è possibile, ma non è intenzionale. TSO Comprehensive (UE) utilizza una KB per il report delle varianti senza annotare esplicitamente se sono di origine germinale o somatica.
- La KB include solo associazioni terapeutiche, diagnostiche e prognostiche rilevanti per le varianti presenti in una determinata neoplasia maligna solida. Le associazioni di suscettibilità o di rischio di tumore non sono incluse nella KB.
- La tabella seguente mostra le variazioni nucleotidiche per tre varianti RET che il dosaggio non è in grado di rilevare. È possibile rilevare altre variazioni nucleotidiche per la stessa variazione aminoacidica.

Tabella 3 Variazioni dei nucleotidi per tre varianti di RET

Modifica dell'amminoacido	Chr*	Posizione	Reference Allele (Allele di riferimento)	Alternativo
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG
				TGCGGCCG
p.E632_ C634delinDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA
				CAAAGAGA
				CAAAAAGG
				CCAAAAGG
				CTAAGAGG

* Chr = Cromosoma

Componenti del prodotto

Il TSO Comprehensive (UE) test è costituito dai componenti seguenti:

- Kit TruSight Oncology Comprehensive (UE) (Illumina n. di catalogo 20063092): il kit include reagenti con volume sufficiente per generare 24 librerie di DNA e 24 librerie di RNA. Questo volume include i campioni e i controlli dei pazienti. Controlli venduti separatamente (consultare *Reagenti richiesti, non forniti* alla pagina 18).
- Knowledge Base: Aggiornato regolarmente e disponibile per il download sul portale Lighthouse Illumina.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (Illumina n. di catalogo 20051843), che include i seguenti componenti:
  - Pacchetti istanze TSO Comprehensive
  - Suite del software TSO Comprehensive
  - Kit USB TSO Comprehensive

Un rappresentante dell'assistenza Illumina installa la versione appropriata di Modulo di analisi TSO Comprehensive (UE) su Local Run Manager strumento NextSeq 550Dx. Per informazioni sul modulo di analisi, consultare Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661).

Reagenti

Reagenti forniti

Con il kit del saggio TSO Comprehensive (UE) vengono forniti i seguenti reagenti.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, n. codice 20031127

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali, DNA polimerasi, RNasi H e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali ed esameri random	Tra -25 °C e -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente reverse transcriptase	Tra -25 °C e -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), n. codice 20031118

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA polimerasi e polinucleotide chinasi T4	Tra-25 °C e -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e nucleotidi	Tra-25 °C e -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra-25 °C e -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente ligasi	Tra-25 °C e -15 °C

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi di sequenziamento universali	Tra -25 °C e -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi di sequenziamento universali	Tra -25 °C e -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra -25 °C e -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA polymerase e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), n. codice 20031119

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra 2 °C e 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Soluzione acquosa contenente microsfere magnetiche	Tra 2 °C e 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Soluzione Tris EDTA	Tra 2 °C e 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, n. codice 20031120

Ingredienti attivi: Soluzione acquosa tamponata contenente primer oligonucleotidici con codice a barre singolo.

⚠ ATTENZIONE

Per campioni di RNA o DNA, utilizzare index primer con indice univoco (UPxx). Non combinare tra loro gli index primer CPxx e UPxx nella stessa libreria.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, n. codice 20031126

Ingredienti attivi: Soluzione acquosa tamponata contenente primer oligonucleotidici con codice a barre singolo.

⚠ ATTENZIONE

Utilizzare gli index primer combinatori (CPxx) solo per i campioni di DNA. Non combinare tra loro gli index primer CPxx e UPxx nella stessa libreria.

Index primer	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Indice i7	Sequenziamento	Indice i5	Sequenziamento	Temperatura di conservazione
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	Tra -25 °C e -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	Tra -25 °C e -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	Tra -25 °C e -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	Tra -25 °C e -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	Tra -25 °C e -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	Tra -25 °C e -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	Tra -25 °C e -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	Tra -25 °C e -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	Tra -25 °C e -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	Tra -25 °C e -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	Tra -25 °C e -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	Tra -25 °C e -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	Tra -25 °C e -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	Tra -25 °C e -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	Tra -25 °C e -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	Tra -25 °C e -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), n. codice 20031123

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente formammide e sali	Tra 2 °C e 8 °C

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali e microsfere paramagnetiche in fase solida rivestiti covalentemente con streptavidina	Tra 2 °C e 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Soluzione di idrossido di sodio	Tra 2 °C e 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Soluzione acquosa tamponata	Tra 2 °C e 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente microsfere paramagnetiche in fase solida	Tra 2 °C e 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	La soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	Tra 2 °C e 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra 2 °C e 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Da 2 °C a 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Soluzione acquosa contenente microsfere magnetiche	Tra 2 °C e 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), n. codice 20031121

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente oligonucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sali	Tra -25 °C e -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente detergente	Tra -25 °C e -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA polymerase e nucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente primer P5 e P7	Tra -25 °C e -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	La soluzione acquosa tamponata contenente sali, 2-mercaptoetanolo e formammide	Tra -25 °C e -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 o PhiX)	20031492	1	10 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente DNA genomico PhiX	Tra -25 °C e -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, n. codice 20031122

Reagente	Codice dell'articolo	Quantità	Volume	Ingredienti attivi	Temperatura di conservazione
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Raggruppamento sonda oligonucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Raggruppamento sonda oligonucleotidi	Tra -25 °C e -15 °C

Reagenti richiesti, non forniti

Reagenti pre-amplificazione

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents: per i requisiti dei reagenti, consultare *Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico* alla pagina 28.
- DNA and RNA Quantification Reagents: per i requisiti dei reagenti, consultare *Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico* alla pagina 28.
- Controlli TruSight Oncology:
  - TruSight Oncology DNA Control (Illumina n. di catalogo 20065041)
  - TruSight Oncology RNA Control (Illumina n. di catalogo 20065042)
- Etanolo (EtOH) 100% (200 proof), grado biologia molecolare
- Acqua priva di DNasi/RNasi

Reagenti post-amplificazione

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cicli) (Illumina n. di catalogo 20028871)
  - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cicli)
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli)
  - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cicli)
- Etanolo, 100% (200 proof), biologia molecolare
- Acqua priva di DNasi/RNasi

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Le seguenti confezioni di reagenti vengono spedite congelate. Conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.

Confezione	Codice dell'articolo	Area di laboratorio
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pre-amplificazione

Confezione	Codice dell'articolo	Area di laboratorio
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Post-amplificazione
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amplificazione

⚠ ATTENZIONE

Non conservare i reagenti in un'unità di stoccaggio antibrina o negli scomparti dello sportello del frigorifero.

Le seguenti confezioni di reagenti vengono spedite in imballaggi di gel refrigerante in grado di mantenere una temperatura da 0 °C a 10 °C. Conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

Confezione	Codice dell'articolo	Area di laboratorio
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Pre-amplificazione
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Post-amplificazione

⚠ ATTENZIONE

Non congelare i reagenti contenenti microsfere (LNB1, SPB e SMB).

- Cambiamenti nell'aspetto fisico dei reagenti possono indicare un deterioramento dei materiali. Se si verificassero cambiamenti nell'aspetto fisico (ad esempio, cambiamenti nel colore del reagente o intorbidimento), non usare i reagenti.
- FSM, SSM, ERA1-B e TCB1 possono presentare particolati correlati al prodotto. Seguire le linee guida specifiche per la manipolazione di ciascun reagente. Dopo aver eseguito le fasi di miscelazione FSM e SSM, i residui di particolati bianchi correlati al prodotto non influiranno sulle prestazioni.
- La stabilità del saggio TSO Comprehensive (UE) è stata valutata e le prestazioni sono state dimostrate per un massimo di quattro utilizzi del kit. I reagenti sono stabili se conservati alle temperature specificate fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta della confezione.

Apparecchiature e materiali

Apparecchiature e materiali richiesti, non forniti

Apparecchiature e materiali per pre-amplificazione

Apparecchiatura	Fornitore
Sonificatore a ultrasuoni e relativi accessori Consultare *Impostazioni di configurazione del sonificatore a ultrasuoni per la frammentazione del DNA* alla pagina 24.	Fornitore di laboratorio generico
Ciclatore termico dotato delle seguenti specifiche: • Coperchio riscaldato in grado di essere impostato a una temperatura di 30 °C e 100 °C (o spento se non è in grado di raggiungere i 30 °C) • Comprende un intervallo di temperatura da 4 °C a 99 °C • Accuratezza temperatura ±0,25 °C • Compatibile con piastre PCR a 96 pozzetti da 0,2 ml • Consultare *Velocità di rampa del ciclatore termico* alla pagina 26	Fornitore di laboratorio generico
Vortex	Fornitore di laboratorio generico
Incubatori per microcampioni (2) con inserti per piastre MIDI a 96 pozzetti (2)	Fornitore di laboratorio generico
Microcentrifuga	Fornitore di laboratorio generico
Centrifuga per piastre con le specifiche seguenti: • Compatibile con micropiastre MIDI a 96 pozzetti • Capacità: 280 × g (+/- 10%)	Fornitore di laboratorio generico
Shaker per piastre con le specifiche seguenti: • Raggio orbitale di 2 mm • Capacità di agitare a 1.200 e 1.800 giri/min	Fornitore di laboratorio generico
Cuneo o rullo sigillante	Fornitore di laboratorio generico
Supporto magnetico con le seguenti specifiche: • Progettato per la precipitazione/separazione di microsfere paramagnetiche • Magneti sul lato del supporto (non sul fondo) • Compatibile con le piastre MIDI a 96 pozzetti	Fornitore di laboratorio generico

Apparecchiatura	Fornitore
Pipette di precisione in grado di erogare con precisione volumi compresi tra 2 µl e 1.000 µl con le seguenti specifiche: • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 0,02 µl • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 0,1 µl, 0,2 µl o 0,5 µl • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 1 µl o 2 µl Le pipette devono essere calibrate regolarmente e con una precisione del 5% rispetto al volume dichiarato.	Fornitore di laboratorio generico
Dosatore pipette	Fornitore di laboratorio generico
Blocco ghiaccio o freddo	Fornitore di laboratorio generico
Pipette sierologiche da 10 ml	Fornitore di laboratorio generico
Sigillo adesivo per piastre a 96 pozzetti con le seguenti specifiche: • Rimovibile • Adatto per piastre PCR skirted o semiskirted • Adesivo forte in grado di resistere a più sbalzi di temperatura da -20 °C a 100 °C • Privo di DNasi/RNasi	Fornitore di laboratorio generico
Provette per microcentrifuga da 1,7 ml, prive di nucleasi	Fornitore di laboratorio generico
Serbatoi di reagente privi di nucleasi (monouso, 50 ml) (o equivalente)	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 15 ml	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 50 ml	Fornitore di laboratorio generico
Punte per pipette dotate di barriera aerosol compatibili	Fornitore di laboratorio generico
Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)	Fisher Scientific, n. codice AB-0859 o equivalente
Piastre PCR a 96 pozzetti compatibili con termociclatore, 0,2 ml (pozzetti in polipropilene)	Fornitore di laboratorio generico

Apparecchiature e materiali per post-amplificazione

Apparecchiatura	Fornitore
Strumento NextSeq 550Dx	Illumina, N. di catalogo 20005715
Centrifuga per piastre con le specifiche seguenti: • Compatibile con micropiastre MIDI a 96 pozzetti • Capacità: 280 × g (+/- 10%)	Fornitore di laboratorio generico
Ciclatore termico dotato delle seguenti specifiche: • Coperchio riscaldato (100 °C) • Comprende un intervallo di temperatura da 4 °C a 99 °C • Accuratezza temperatura ±0,25 °C • Compatibile con piastre PCR a 96 pozzetti da 0,2 ml • Consultare *Velocità di rampa del ciclatore termico* alla pagina 26	Fornitore di laboratorio generico
Vortex	Fornitore di laboratorio generico
Incubatore per microcampioni con inserto per piastre MIDI a 96 pozzetti	Fornitore di laboratorio generico
Blocco termico secco con le seguenti specifiche: • Intervallo di temperatura da 25 °C a 99 °C • Accuratezza temperatura ±5 °C • Assicurarsi che le provette per microcentrifuga siano compatibili con il blocco di calore	Fornitore di laboratorio generico
Shaker per piastre con le specifiche seguenti: • Raggio orbitale di 2 mm • Capacità di agitare a 1.200 e 1.800 giri/min	Fornitore di laboratorio generico
Microcentrifuga	Fornitore di laboratorio generico
Cuneo o rullo sigillante	Fornitore di laboratorio generico
Supporto magnetico con le seguenti specifiche: • Progettato per la precipitazione/separazione di microsfere paramagnetiche • Magneti sul lato del supporto (non sul fondo) • Compatibile con le piastre MIDI a 96 pozzetti	Fornitore di laboratorio generico

Apparecchiatura	Fornitore
Pipette di precisione in grado di erogare con precisione volumi compresi tra 2 µl e 1.000 µl con le seguenti specifiche: • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 0,02 µl • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 0,1 µl, 0,2 µl o 0,5 µl • Pipetta monocanale o multicanale con incremento di 1 µl o 2 µl Le pipette devono essere calibrate regolarmente e con una precisione del 5% rispetto al volume dichiarato.	Fornitore di laboratorio generico
Dosatore pipette	Fornitore di laboratorio generico
Pipette sierologiche da 10 ml	Fornitore di laboratorio generico
Sigillo adesivo per piastre a 96 pozzetti con le seguenti specifiche: • Rimovibile • Adatto per piastre PCR skirted o semiskirted • Adesivo forte in grado di resistere a più sbalzi di temperatura da -20 °C a 100 °C • Privo di DNasi/RNasi	Fornitore di laboratorio generico
Provette per microcentrifuga da 2 ml, prive di nucleasi	Fornitore di laboratorio generico
Provette per microcentrifuga da 1,7 ml, prive di nucleasi	Fornitore di laboratorio generico
Serbatoi di reagente privi di nucleasi (monouso, 50 ml) (o equivalente)	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 15 ml	Fornitore di laboratorio generico
Provette coniche da 50 ml	Fornitore di laboratorio generico
Punte per pipette dotate di barriera aerosol compatibili	Fornitore di laboratorio generico
Piastre di conservazione a 96 pozzetti, 0,8 ml (piastre MIDI)	Fisher Scientific, n. codice AB-0859 o equivalente
Piastre PCR a 96 pozzetti compatibili con termociclatore, 0,2 ml (pozzetti in polipropilene)	Fornitore di laboratorio generico
Blocco ghiaccio o freddo	Fornitore di laboratorio generico

Impostazioni di configurazione del sonificatore a ultrasuoni per la frammentazione del DNA

La frammentazione o shearing del DNA influisce sulle prestazioni del saggio determinando la distribuzione della dimensione del frammento che, a sua volta, influisce sulla copertura di sequenziamento. Sono state valutate diverse configurazioni mirate di sonificatori a ultrasuoni e ottimizzate per il saggio TSO Comprehensive (UE) (Tabella 4).

- La durata dello shearing è stata regolata per massimizzare la metrica MEDIAN_EXON_COVERAGE indicata nella sezione *Controllo qualità* alla pagina 83. Le durate dello shearing (indicate in grassetto nella Tabella 4) e i risultati di MEDIAN_INSERT_SIZE differiscono tra le varie configurazioni.
- Le configurazioni 1–4 e 6 sono state testate con provette di vetro a 8 strisce. La configurazione 5 ha utilizzato una singola provetta di vetro. Le capacità di volume delle provette sono mostrate nella Tabella 4.
- L'ottimizzazione delle configurazioni 3-6 (volumi di bagno d'acqua più piccoli) ha utilizzato impulsi.
- Le configurazioni 3-5 sono state divise in provette di volume inferiore. Le capacità di volume delle provette influiscono sui parametri di shearing.
- La configurazione 4 (trasduttore di linea, volume del bagno d'acqua medio, acqua degassata) ha richiesto un lungo tempo di ritardo dell'impulso (40 secondi) per ottenere un MEDIAN_EXON_COVERAGE simile a quello delle configurazioni 1 e 2 con un ingresso nominale di 40 ng.
- Le impostazioni ottimali per la configurazione 3 hanno determinato una distribuzione delle dimensioni dei frammenti leggermente più ampia rispetto alle altre configurazioni (MEDIAN_INSERT_SIZE era di circa 5-10 coppie di basi più grande).
- Le configurazioni 3 e 5 hanno utilizzato acqua non degassata e il più piccolo volume di bagno d'acqua.
- Le configurazioni 3 e 5 hanno richiesto un aumento dell'input di DNA (50 ng per la configurazione 3, 60 ng per la configurazione 5) per ottenere un MEDIAN_EXON_COVERAGE simile rispetto alle altre 4 configurazioni, che hanno utilizzato l'input nominale di 40 ng.
- Le configurazioni 3 e 5 sono più danneggiate e/o denaturate e pertanto avevano una ridotta quantità effettiva di molecole dsDNA utilizzabili per la preparazione delle librerie.

Centrifugare le provette contenenti il materiale di shearing per assicurarsi che il volume specificato venga recuperato in quanto qualsiasi perdita di materiale può influire negativamente sulle prestazioni.

Tabella 4 Configurazioni mirate e valutate di sonificatori a ultrasuoni

Parametro	Configurazione					
	1	2	3	4	5	6
Trasduttore	Linea	Punto	Punto	Linea	Punto	Linea
Volume bagno d'acqua	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Acqua degassata	Sì	Sì	No	Sì	No	Sì
Raffreddatore d'acqua	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Temperatura bagno d'acqua	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20°C	10 °C
Potenza momento di picco (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% fattore di utilizzazione	30	10	30	25	20	25
Cicli per impulsi	200	200	1.000	1.000	1.000	600
Impulsi (pulsazioni di 10 secondi)	No	No	Sì	Sì	Sì	Sì
Tempo di ritardo degli impulsi	N/D	N/D	10 s	40 s	10 s	10 s
Durata shearing	250 s	280 s	200 s[1]	320 s[2]	200 s[1]	320 s[2]
Elaborazione campione	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Dimensione batch	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Dimensione campione per provetta in vetro a otto strisce	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Provetta singola (50 µl)	130 µl (o piastra per 96 microPROVETTE)
Distribuzione del rumore	NA	NA	N/D	3 mm Y a 20 mm/s	N/D	1,5 mm Y a 10 mm/s
Equivalente input di DNA (per copertura mediana degli esoni)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

[1] La durata dello shearing di 200 secondi consiste in impulsi da 10 secondi con 20 ripetizioni.
[2] La durata dello shearing di 320 secondi consiste in impulsi da 10 secondi con 32 ripetizioni.

Velocità di rampa del ciclatore termico

La velocità di rampa del ciclatore termico influisce sulle metriche di controllo qualità del saggio (Siti MSI utilizzabili, Conteggio raggruppato mediano CNV target, Dimensione inserto mediana (RNA)) e sulle letture di supporto per varianti di splicing e fusioni. Si raccomanda l'ottimizzazione della velocità di rampa del ciclatore termico. Ad esempio, un modello testato è stato regolato da una velocità di rampa predefinita (e massima) di 5°C/s a 3°C/s per ottenere risultati paragonabili ad altri modelli con velocità di rampa predefinite inferiori.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

Seguire le procedure standard per la raccolta, il trasporto, la conservazione e l'elaborazione dei campioni.

Requisiti dei campioni

Tessuto in FFPE

Il saggio TSO Comprehensive (UE) richiede 40 ng di RNA e/o 40 ng di DNA estratti da tessuto in FFPE. L'uso sia di RNA che di DNA consente l'analisi di tutti i tipi di varianti dichiarate. Il tessuto deve essere fissato utilizzando un fissativo a base di formalina adatto per le analisi molecolari (ad esempio, formalina neutra al 10%). Il tessuto non deve essere decalcificato. Prima di eseguire il saggio TSO Comprehensive (UE), il campione di tessuto deve essere esaminato da un patologo per assicurarsi che sia adatto per questo test. È richiesto un contenuto minimo di tumore del 20% (per area) per rilevare le mutazioni somatiche "driver". Il rilevamento affidabile dello stato MSI su una varietà di campioni richiede un contenuto tumorale minimo del 30%. Se un campione fosse analizzato con un contenuto tumorale inferiore al 30% per determinare gli esiti con altri tipi di varianti, il risultato MSS-Stable potrebbe non essere affidabile. Il risultato MSI-High è corretto indipendentemente dal contenuto tumorale.

Il contenuto di tumore per le amplificazioni geniche e per le varianti di RNA dipende dalla misura dell'amplificazione o dell'espressione (consultare *Contenuto di tumore* alla pagina 108).

Per un'elevata probabilità di estrarre 40 ng di RNA e 40 ng di DNA da vari tipi di tessuto solido, il volume di tessuto raccomandato è ≥ 1,0 mm^3. Questo volume equivale a un'area tissutale vitale cumulativa ≥ 200 mm^2 utilizzando sezioni spesse 5 µm o ≥ 100 mm^2 utilizzando sezioni spesse 10 µm. L'area cumulativa del tessuto è la somma dell'area del tessuto utilizzabile in tutte le sezioni sottoposte all'estrazione. Ad esempio, un'area di tessuto cumulativa di 200 mm^2 potrebbe essere ottenuta estraendo quattro sezioni da 5 µm con 50 mm^2 di area di tessuto ciascuna o cinque sezioni da 10 µm con 20 mm^2 di area di tessuto ciascuna. La necrosi del tessuto potrebbe diminuire la quantità di acido nucleico prodotto. Per ridurre al minimo la possibilità di risultati falsi negativi, il tessuto può essere macrodissezionato per ottenere un contenuto di tumore utilizzabile.

Quantità elevate di tessuto necrotico (≥23% per area) può interferire con la capacità del saggio TSO Comprehensive (UE) di rilevare le amplificazioni geniche e le fusioni di RNA. Se le sezioni del campione contenessero più del 23% di necrosi nell'area totale del tessuto, il tessuto necrotico deve essere quindi sottoposto a macrodissezione. Se il laboratorio esegue l'RNA con il saggio, il tessuto con emoglobina deve essere evitato o ridotto al minimo quando si prelevano sezioni dal blocchetto di tessuto. Consultare *Sostanze interferenti* alla pagina 99.

Il tessuto FFPE montato su vetrino può essere conservato per un massimo di 28 giorni a temperatura ambiente.

Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico

- Estrarre RNA e DNA dai campioni di tessuto in FFPE utilizzando i kit di estrazione disponibili in commercio. Le differenze nei kit di estrazione possono influire sulle prestazioni. Consultare *Valutazione di Nucleic Acid Extraction Kit* alla pagina 97.
- Non aumentare la proteinasi K o un enzima equivalente durante l'estrazione dalla concentrazione standard fornita in un kit di estrazione. Consultare *Sostanze interferenti* alla pagina 99.
- Conservare l'acido nucleico estratto seguendo le istruzioni del produttore del kit di estrazione.
- Conservare il DNA estratto per un massimo di 28 giorni a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.
- Conservare il DNA estratto per un massimo di 28 giorni a una temperatura compresa tra -85 °C e -65 °C.
- Per evitare modifiche nella concentrazione nel tempo, misurare il DNA e l'RNA entro 28 giorni dall'inizio della preparazione delle librerie. Quantificare l'RNA e il DNA utilizzando un metodo di quantificazione fluorometrico che utilizza coloranti per legame dell'acido nucleico. La concentrazione di acido nucleico deve risultare da una media di almeno tre misurazioni.
- Il saggio richiede 40 ng di ciascun campione di RNA preparato in acqua priva di DNasi/RNasi (non fornita), con un volume finale di 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Il saggio richiede 40 ng di ciascun campione di gDNA con una concentrazione di estrazione minima di 3,33 ng/µl. La frammentazione (shearing) richiede un volume finale di 52 µl (0,77 ng/µl) con un minimo di 40 µl di TEB (fornito) utilizzato come diluente.

Conservazione delle librerie

Conservare le librerie nelle piastre PCR a basso legame per un periodo compreso tra 7 e 32 giorni, a seconda del tipo di libreria (consultare la Tabella 5).

Tabella 5 Tempistiche di conservazione delle librerie

Tipo di libreria	Piastra	Numero di giorni	Temperatura di conservazione
cDNA	PCF PCR	≤ 7	Tra -25 °C e -15 °C
gDNA frammentato	LP PCR	≤ 7	Tra -25 °C e -15 °C
Pre-arricchimento	ALS PCR	≤ 30	Tra -25 °C e -15 °C
Post-arricchimento	ELU2 PCR	≤ 7	Tra -25 °C e -15 °C
PCR post-arricchimento	PL PCR	≤ 30	Tra -25 °C e -15 °C
Normalizzata	NL PCR	≤32	Tra -25 °C e -15 °C

Avvertenze e precauzioni

Sicurezza

⚠ AVVERTENZA

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Durante la manipolazione di materiali pericolosi nei reagenti deve esservi una ventilazione appropriata. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni pertinenti a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni ambientali, di salute e di sicurezza, consultare le SDS alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

- **Maneggiare tutti i campioni come se fossero infetti.**
- **Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del saggio indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del saggio lavarsi bene le mani.**

Laboratorio

- Per evitare la contaminazione, all'interno del laboratorio organizzare un flusso di lavoro unidirezionale. Le aree di pre-amplificazione e post-amplificazione devono essere dotate di apparecchiature e materiali dedicati (ad esempio pipette, punte per pipette, vortex e centrifuga). Per prevenire il carryover del prodotto di amplificazione o della sonda, non tornare nell'area di pre-amplificazione dopo essere entrati nell'area di post-amplificazione.
- Eseguire le fasi di indicizzazione PCR e di arricchimento in un'area post-amplificazione per evitare il carry-over del prodotto dell'amplificazione.
- Le procedure di preparazione delle librerie richiedono un ambiente privo di RNasi/DNasi. Decontaminare accuratamente le aree di lavoro con un detergente inibitore di RNasi/DNasi. Utilizzare plastica certificata priva di DNasi, RNasi e DNA genomico umano.
- Per le procedure di post-amplificazione, prima e dopo ogni procedura, pulire accuratamente le superfici di lavoro e le apparecchiature utilizzando una soluzione di ipoclorito di sodio (NaOCl) allo 0,5% preparata al momento. Lasciare la soluzione a contatto con le superfici per 10 minuti, quindi pulire accuratamente con alcol etilico o isopropilico al 70%.
- Utilizzare provette da microcentrifuga, piastre, punte di pipette e serbatoi privi di nucleasi.

- Utilizzare apparecchiature calibrate per tutte le fasi del saggio. Assicurarsi di calibrare le apparecchiature alle velocità, temperature e volumi specificati in questo protocollo.
- Utilizzare pipette di precisione per garantire un'accurata erogazione di reagenti e campioni. Calibrare regolarmente secondo le specifiche del produttore.
- Quando si utilizzano pipette multicanale, attenersi alle seguenti linee guida:
  - Pipettare un minimo di ≥ 2 µl.
  - Assicurarsi che le punte a barriera siano ben aderenti e appropriate alla marca e al modello della pipetta multicanale.
  - Fissare le punte con un movimento rotatorio per garantire che tutte le punte siano ben fissate.
  - Aspirare con un angolo di 90°, con uguali livelli di volume di liquido in tutte le punte.
  - Miscelare tutti i componenti dopo l'erogazione pipettando la miscela di reazione verso l'alto e verso il basso.
  - Dopo l'erogazione, verificare che il liquido sia stato completamente erogato da ogni punta.
- Assicurarsi di utilizzare le apparecchiature specificate per il test e di impostare i programmi come indicato.
- Le temperature dichiarate per il ciclatore termico e l'incubatore di microcampioni indicano la temperatura di reazione, non necessariamente la temperatura impostata sull'apparecchiatura.

Saggio

- Evitare la contaminazione incrociata.
  - Quando si maneggiano campioni e reagenti, seguire le corrette pratiche di laboratorio.
  - Tra un campione e l'altro e tra un'erogazione e l'altra dei reagenti, usare utensili da laboratorio e punte di pipette nuovi.
  - Per ridurre il rischio di contaminazione incrociata, utilizzare punte dotate di barriera aerosol.
  - Quando ci si sposta dalle aree di pre-amplificazione a quelle di post-amplificazione, utilizzare un flusso di lavoro unidirezionale.
  - Maneggiare e aprire solo un index primer alla volta. Richiudere ogni provetta di indice immediatamente dopo l'uso. Il kit contiene dei tappi extra.
  - Cambiare i guanti spesso e ogni volta che entrano in contatto con gli index primer o i campioni.
  - Rimuovere le provette di index primer inutilizzate dall'area di lavoro.
  - Non ricollocare i reagenti nelle provette di conservazione dopo averli utilizzati in una provetta in striscia, vaschette o serbatoi.
  - Miscelare i campioni con una pipetta e centrifugare la piastra ove indicato.
  - Utilizzare uno shaker per micropiastre. Non agitare le piastre.
- Non scambiare i componenti dei saggi appartenenti a diversi lotti di kit di reagente. I lotti dei kit di reagente sono identificati dall'etichetta sulla scatola del kit di reagente e sul foglio dei lotti principale.

- Per evitare che le nucleasi e i prodotti PCR contaminino i reagenti, la strumentazione, i campioni e le librerie, è necessario attivare prassi di laboratorio adeguate. La contaminazione da nucleasi e prodotti per PCR può causare risultati inesatti e inaffidabili.
- Per avere prestazioni del saggio e condizioni di conservazione ottimali, è necessario utilizzare tipi di piastra appropriati. Per il trasferimento della piastra attenersi a quanto riportato nelle *Istruzioni per l'uso* alla pagina 40.
- Il mancato rispetto delle procedure descritte può causare risultati errati o una significativa riduzione della qualità delle librerie.
- Se le *Istruzioni per l'uso* alla pagina 40 non specificassero un punto di arresto sicuro, passare immediatamente al passaggio successivo.
- Conservare i reagenti o i componenti del saggio alla temperatura specificata nelle aree designate per la pre-amplificazione e per la post-amplificazione.
- Non conservare i reagenti in un'unità di stoccaggio antibrina o negli scomparti dello sportello del frigorifero.
- Non congelare i reagenti contenenti microsfere (LNB1, SPB e SMB).
- Non utilizzare reagenti conservati in modo improprio.
- Non utilizzare procedure di miscelazione e manipolazione diverse da quelle specificate per ciascun reagente. La miscelazione inadeguata o l'eccessivo utilizzo del vortex sui reagenti può causare risultati dei campioni errati.
- FSM, SSM, ERA1-B e TCB1 possono presentare particolati correlati al prodotto. Seguire le linee guida specifiche per la manipolazione di ciascun reagente. Dopo aver eseguito le fasi di miscelazione FSM e SSM, i residui di particolati bianchi correlati al prodotto non influiranno sulle prestazioni.
- Preparare le miscele master al momento ed eliminare il volume rimanente dopo l'uso.
- Per le fasi di lavaggio, preparare sempre al momento la soluzione di etanolo all'80% con RNase/DNase-free water. L'etanolo può assorbire acqua dall'aria; questo potrebbe influire sui risultati. Smaltire l'etanolo all'80% dopo l'uso in conformità alle normative locali, nazionali e/o federali.
- Trasferire il volume specificato di eluato. Trasferire un volume di eluato inferiore a quanto specificato durante i passaggi di eluizione potrebbe influire sui risultati.
- Per il sonificatore a ultrasuoni, attenersi alle seguenti linee guida. Assicurarsi di seguire le istruzioni del produttore.
  - Caricare il gDNA nella provetta del sonificatore a ultrasuoni lentamente per evitare di creare bolle. Bolle eccessive o un vuoto d'aria nella provetta dell'eluente potrebbero causare una frammentazione incompleta.
  - Effettuare l'erogazione nelle provette del sonificatore a ultrasuoni lentamente ed evitare spruzzi.
  - Durante la rimozione del DNA frammentato, per evitare lo spostamento del fluido e la perdita di campione, non inserire la punta della pipetta sul fondo della provetta del sonificatore a ultrasuoni.
- Non pipettare meno di 2 µl di input di campione.

- Non utilizzare una vaschetta per dispensare i reagenti per le fasi che richiedono meno di 10 µl di materiale da aggiungere a ciascun pozzetto del campione.
- Quando si trasferiscono i campioni di gDNA frammentato dalle provette del sonificatore a ultrasuoni alla piastra Preparazione librerie (LP) utilizzare una pipetta dalla punta sottile.
- Non combinare tra loro gli adattatori UMI e SUA1.
- Per i campioni di RNA, utilizzare gli adattatori SUA1.
- Per i campioni di DNA, utilizzare gli adattatori UMI.
- Assegnare diversi index primer a ciascun campione di libreria per identificare in modo univoco ciascuna libreria quando viene raggruppata per il sequenziamento su una singola cella a flusso.
- Non combinare gli index primer CPxx e UPxx nella stessa libreria.
- Le discordanze tra campioni e index primer causano la segnalazione di risultati errati a causa della perdita dell'identificazione positiva del campione. Prima di avviare la preparazione delle librerie, immettere gli ID dei campioni e assegnare gli indici in Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module. Durante la preparazione delle librerie, prendere nota degli ID dei campioni, dell'indicizzazione e dell'orientamento dei pozzetti della piastra per riferimento futuro.
- Per le librerie derivate da campioni di RNA, utilizzare solo gli indici UPxx.
- Per le librerie derivate da campioni di DNA, utilizzare gli indici UPxx o gli indici CPxx.
- Sequenziare un massimo di 8 librerie di RNA e 8 librerie di DNA per ogni cella a flusso. Sequenziare almeno tre librerie. Attenersi alle linee guida descritte in *Numero delle librerie e selezione degli indici* alla pagina 36.
- Dopo la fase di legame in *Target di cattura Uno* alla pagina 62 e in *Target di cattura Due* alla pagina 66, passare immediatamente alla fase di lavaggio per evitare che il pellet di microsfere si asciughi.
- Durante le fasi di lavaggio, rimuovere l'etanolo all'80% dal fondo dei pozzetti. È stato dimostrato che l'etanolo residuo influisce sui risultati.
- Per prestazioni ottimali del saggio, seguire il numero specificato di lavaggi indicato nelle *Istruzioni per l'uso* alla pagina 40.
- Durante la procedura *Normalizzazione delle librerie* alla pagina 73, per ottenere una densità di cluster coerente sulla cella a flusso, risospendere accuratamente il pellet di microsfere della libreria.
- Riferire immediatamente qualsiasi incidente serio relativo a questo prodotto a Illumina e alle autorità competenti degli stati membri nei quali l'utente e il paziente sono residenti.

Note sulla procedura

- Il flusso di lavoro di TSO Comprehensive (UE) può essere condotto secondo il seguente programma.
  - Giorno 1: sintesi di cDNA da campioni di RNA, frammentazione del DNA di campioni di gDNA, preparazione delle librerie e avvio della (prima) ibridazione notturna.

  - Giorno 2: arricchimento, normalizzazione delle librerie arricchite e caricamento delle librerie sullo strumento NextSeq 550Dx.

  Se non fosse possibile eseguire il flusso di lavoro di TSO Comprehensive (UE) secondo questo programma, all'interno del protocollo vengono specificati diversi punti di arresto sicuro. Se il protocollo non specificasse un punto di arresto sicuro, passare immediatamente al passaggio successivo.
- Le librerie derivate da campioni di RNA e DNA possono essere preparate contemporaneamente in pozzetti separati.
- Le tabelle di preparazione della miscela master includono il volume in eccesso per garantire che ci sia un volume sufficiente per il numero di campioni da elaborare.
- Utilizzare acqua di grado molecolare priva di nucleasi.
- Dopo l'aggiunta dei reagenti, risciacquare la punta aspirando ed erogando una volta nel pozzetto appropriato della piastra, se non diversamente specificato nella procedura.
- Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- Reagenti, campioni e librerie devono essere mantenuti al freddo in determinate fasi nelle Istruzioni per l'uso. Si intende la conservazione in ghiaccio o equivalente.

Programmi del ciclatore termico

- Effettuare la programmazione del ciclatore termico sulle apparecchiature di pre-amplificazione e post-amplificazione prima di avviare il protocollo.
- Assicurarsi che le piastre PCR si adattino perfettamente al ciclatore termico.
- Utilizzare piastre raccomandate dal produttore del ciclatore termico.

Sigillatura e rimozione della sigillatura dalla piastra

- Sigillare sempre le piastre con un nuovo sigillo adesivo. Non riutilizzare i sigilli.
- Per sigillare la piastra, applicare con cura la copertura adesiva alla piastra utilizzando un cuneo o un rullo sigillante.
- Sigillare sempre la piastra a 96 pozzetti con un nuovo sigillo adesivo per piastre prima di passare alle fasi successive del protocollo.
  - Fasi di agitazione della piastra
  - Fasi di centrifugazione
  - Fasi del ciclatore termico
  - Ibridazioni
  - Conservazione a lungo termine
- Assicurarsi che i bordi e i pozzetti siano sigillati per ridurre il rischio di contaminazione incrociata e di evaporazione.
- Posizionare la piastra su una superficie piatta prima di rimuovere lentamente la sigillatura.

- Prima di rimuovere la sigillatura, se si nota la presenza di fluido o condensa sul sigillo o sulle pareti laterali dei pozzetti della piastra, centrifugare a 280 × g per un minuto.
- Utilizzare sigilli adesivi per piastre che siano efficaci da -20 °C a 100 °C e adatti a piastre PCR skirted o semiskirted.

Apparecchiatura

- Prima di avviare il saggio, assicurarsi che il personale di laboratorio conosca le istruzioni del produttore per il funzionamento e la manutenzione di tutte le apparecchiature.

Tipo di piastra e trasferimento delle piastre

- Per avere prestazioni del saggio e condizioni di conservazione ottimali, è necessario utilizzare tipi di piastra appropriati.
- Quando si trasferiscono volumi tra le piastre, trasferire il volume specificato da ogni pozzetto di una piastra al pozzetto corrispondente della piastra di destinazione.
- Per trasferire campioni tra provette in striscia o piastre è possibile utilizzare pipette multicanale.
- Per agitare le piastre, attenersi alle seguenti linee guida.
  - Agitare le piastre usando uno shaker per piastre. Non agitarle utilizzando un vortex.
  - Agitare le piastre PCR a 1.200 giri/m.
  - Agitare le piastre MIDI a 1.800 giri/m.
  - Seguire le istruzioni del produttore per assicurarsi che lo shaker per piastre sostenga la piastra in modo saldo.

Centrifugazione

- Quando le istruzioni del protocollo indicano di centrifugare brevemente, centrifugare a 280 × g per un minuto.
- Se si osserva del liquido sul sigillo o sui bordi di un pozzetto, centrifugare la piastra a 280 × g per un minuto.

Manipolazione dei reagenti

- Richiudere bene tutte le provette di reagente subito dopo l'uso per limitare l'evaporazione e prevenire la contaminazione.
- Quando i reagenti non sono più necessari per una determinata procedura, riportarli alla temperatura di conservazione specificata.
- Seguire la preparazione dei reagenti che precede ogni sezione della procedura nelle *Istruzioni per l'uso* alla pagina 40.
- Assicurarsi di preparare il volume di miscela master, miscela di eluizione e etanolo all'80% richiesto per il numero di campioni da elaborare.

- I volumi forniti nelle tabelle della miscela master e delle soluzioni contengono un volume in eccesso. I calcoli del volume in eccesso sono i seguenti.
  - Tabella 14
    - Volume di FSM = (7,2 µl) x (numero di campioni + controlli) x (1,25).
    - Volume di RVT = (0,8 µl) x (numero di campioni + controlli) x (1,25).
  - Tabella 21
    - Volume di ERA1-B = (7,2 µl) x (numero di librerie) x (1,20).
    - Volume di ERA1-A = (2,8 µl) x (numero di librerie) x (1,20).
  - Tabella 29
    - Volume di EE2 = (20,9 µl) x (numero di librerie) x (1,364).
    - Volume di HP3 = (1,1 µl) x (numero di librerie) x (1,364).
  - Tabella 30
    - Volume di EE2 = (20,9 µl) x (numero di librerie) x (1,364).
    - Volume di HP3 = (1,1 µl) x (numero di librerie) x (1,364).
  - Tabella 36
    - Volume di LNA1 = (38,1 µl) x (numero di librerie) x (2,0).
    - Volume di LNB1 = (6,9 µl) x (numero di librerie) x (2,0).
  - Tabella 37
    - Volume di EE2 = (30,4 µl) x (numero di librerie) x (1,25).
    - Volume di HP3 = (1,6 µl) x (numero di librerie) x (1,25).

Set di adattatori

- Il saggio TSO Comprehensive (UE) include adattatori SUA1 e adattatori UMI.
- Per i campioni di RNA, utilizzare gli adattatori SUA1. Non utilizzare con campioni di DNA.
- Per i campioni di DNA, utilizzare gli adattatori UMI. Non utilizzare con campioni di RNA.

Manipolazione delle microsfere

- Nel saggio TSO Comprehensive (UE) sono inclusi tre tipi di microsfere (SPB, SMB e LNB1). Assicurarsi che durante la procedura venga utilizzato il tipo di microsfera corretto.
- Eseguire il numero corretto di lavaggi per ciascun tipo di microsfera.
- Assicurarsi che le microsfere siano a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Per garantire l'omogeneità, miscelare le microsfere per un minuto prima dell'uso.

- Quando si mescolano le microsfere con una pipetta, attenersi alle seguenti linee guida:
  - Utilizzare una pipetta e una punta di dimensioni adatte al volume da miscelare.
  - Impostare il volume in modo che sia pari a circa il 50-75% del volume del campione.
  - Pipettare lentamente senza rilasciare lo stantuffo.
  - Evitare di spruzzare e introdurre bolle d'aria.
  - Per rilasciare le microsfere dal pozzetto o dalla provetta, posizionare la punta della pipetta sopra il pellet ed erogare direttamente nel pellet.
  - Assicurarsi che il pellet di microsfere sia completamente in soluzione. La soluzione deve avere un aspetto marrone scuro e una consistenza omogenea.
  - Valutare se è presente un pellet di microsfere. Aspirare con attenzione la soluzione totale di microsfere del pozzetto nella punta e controllare il fondo dei pozzetti.
- Se le microsfere vengono aspirate nelle punte delle pipette durante le fasi di separazione magnetica, erogare nuovamente le microsfere nel pozzetto della piastra sul supporto magnetico. Attendere che il liquido sia trasparente (circa 2 minuti) prima di procedere alla fase successiva della procedura.
- Quando si lavano le microsfere:
  - Utilizzare il supporto magnetico raccomandato per la piastra.
  - Erogare il liquido direttamente sul pellet di microsfere in modo che le microsfere sul lato dei pozzetti si bagnino.
  - Tenere la piastra sul supporto magnetico finché la procedura non specifica di rimuoverla.
  - Non agitare la piastra mentre è sul supporto magnetico.
  - Mentre si trova sul supporto magnetico, non alterare il pellet di microsfere.
- Quando si lavano le microsfere o si rimuove il surnatante, angolare le punte delle pipette sul fondo dei pozzetti per evitare di creare un vuoto e aspirare la soluzione nei filtri delle punte.

Numero delle librerie e selezione degli indici

Prima di impostare la corsa, pianificare il numero di librerie di campioni e gli indici dei campioni per la corsa di sequenziamento. Le seguenti linee guida sul numero di campioni includono i controlli positivi, ma escludono i controlli negativi/senza templato (NTC). Gli NTC devono essere aggiunti alla corsa programmata come campione aggiuntivo.

Per TSO Comprehensive (UE), per determinare il numero di librerie di RNA e/o DNA da sequenziare su una cella a flusso, osservare le linee guida nella Tabella 6 e nella Tabella 7. Consultare la Tabella 6 se si sequenziassero separatamente librerie di RNA *o* di DNA. Consultare la Tabella 7 se si sequenziassero librerie di RNA *e* DNA sulla stessa cella a flusso.

Tabella 6 Sequenziamento di librerie di RNA *o* DNA

Tipo di libreria	Minimo*	Massimo*
Solo RNA	3	16
Solo DNA	3	8

*Gli NTC non contribuiscono alla complessità.

Tabella 7 Sequenziamento delle librerie di RNA *e* DNA sulla stessa cella a flusso

Tipo di libreria	Minimo*	Massimo*
RNA	3	8
DNA	3	8

*Gli NTC non contribuiscono alla complessità.

Per un uso ottimale dei reagenti durante il sequenziamento di librerie di DNA *e* RNA con TSO Comprehensive (UE) su strumento NextSeq 550Dx, 8 librerie di RNA e 8 librerie di DNA per ogni cella a flusso.

Gli index primer identificano in modo univoco ogni campione in modo che le librerie possano essere raggruppate per il sequenziamento su una cella a flusso. Le combinazioni di indici compatibili vengono visualizzate nella schermata Create Run (Crea corsa) durante la configurazione della corsa sul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module. Durante la preparazione delle librerie, aggiungere l'index primer a ciascuna libreria di campioni. ***Usare una miscela di index primer diversa per ogni libreria di campioni.***

Assicurarsi che gli index primer utilizzati con i campioni corrispondano agli indici selezionati per l'analisi con Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module. ***Le discordanze potrebbero causare la segnalazione di risultati errati a causa della perdita dell'identificazione positiva del campione.***

Esistono due tipi di indici nel saggio TSO Comprehensive (UE).

- **Indici UPxx**: utilizzare gli indici UPxx per le librerie derivate da campioni di RNA o DNA.
- **Indici CPxx**: utilizzare gli indici CPxx per le librerie derivate da campioni di DNA. Non usare gli indici CPxx per le librerie derivate da RNA o se si sequenziano solo tre librerie di DNA in totale.

Quando si sequenziano solo tre librerie, è necessario rispettare i seguenti requisiti:

- Le librerie devono essere tutte di DNA o tutte di RNA.
- Non usare i set di indici CPxx.
- Per fornire una varietà sufficiente, è necessario utilizzare uno dei seguenti set di indici UPxx.
  - UP01, UP02 e UP03
  - UP04, UP05 e UP06
  - UP07, UP08 e UP09
  - UP10, UP11 e UP12

  Ad esempio, alla prima libreria è assegnato UP01, alla seconda libreria UP02 e alla terza libreria UP03.

TruSight Oncology Controlli

TSO Comprehensive (UE) richiede Controlli TruSight Oncology, che consiste in TruSight Oncology DNA Control e TruSight Oncology RNA Control come controlli positivi. Includere TruSight Oncology DNA Control per ogni corsa di sequenziamento del DNA e TruSight Oncology RNA Control per ogni corsa di sequenziamento dell'RNA all'interno di un determinato evento di preparazione delle librerie (includono anche i controlli per le corse combinate di DNA e RNA). Per ogni corsa di sequenziamento pianificata, viene preparato un controllo positivo unico. Consultare Inserto della confezione di TruSight Oncology Control (documento n. 200009919) per ulteriori informazioni.

La quantità di input di controllo positivo è di 40 ng per DNA e RNA.

Includono un NTC appropriato in ogni evento di preparazione delle librerie per l'RNA e per il DNA. L'NTC viene sequenziato ripetutamente all'interno di un evento di preparazione delle librerie. Seguire queste linee guida per Controlli TruSight Oncology:

- Preparare le librerie dai controlli positivi e i controlli senza templato in modo identico ai campioni.
- Per il DNA NTC, utilizzare il TEB.
- Per l'RNA NTC, utilizzare acqua priva di DNasi/RNasi.
- I controlli positivi sono inclusi nel requisito massimo della libreria.
- Gli NTC non sono inclusi nel requisito minimo della libreria.
- Utilizzare gli indici UP per l'NTC quando si sequenziano solo 3 librerie.
- Poiché l'NTC viene sequenziato ripetutamente, gli indici selezionati per questo controllo non possono essere ripetuti nell'evento di preparazione delle librerie.

Le tabelle in basso mostrano esempi di layout della piastra per la preparazione delle librerie. Ogni colonna numerata rappresenta una singola corsa di sequenziamento. Quando le librerie di DNA e RNA vengono sequenziate insieme, la serie di colonne corrispondente rappresenta una singola corsa di sequenziamento (ad esempio, colonna 1 e colonna 7). L'NTC viene sequenziato per ogni colonna o set di colonne.

Tabella 8 Evento di preparazione delle librerie di una singola corsa che include sei campioni di pazienti

	1	2	3	4	5	6	7
A	Controllo DNA Pos	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	Controllo RNA Pos
B	DNA 1	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	RNA 1
C	DNA 2	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	RNA 2
D	DNA 3	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	RNA 3
E	DNA 4	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	RNA 4
F	DNA 5	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	RNA 5
G	DNA 6	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	RNA 6
H	DNA NTC	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	vuoto	RNA NTC

Tabella 9 Evento di preparazione delle librerie di tre corse con 20 campioni di pazienti

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

Istruzioni per l'uso

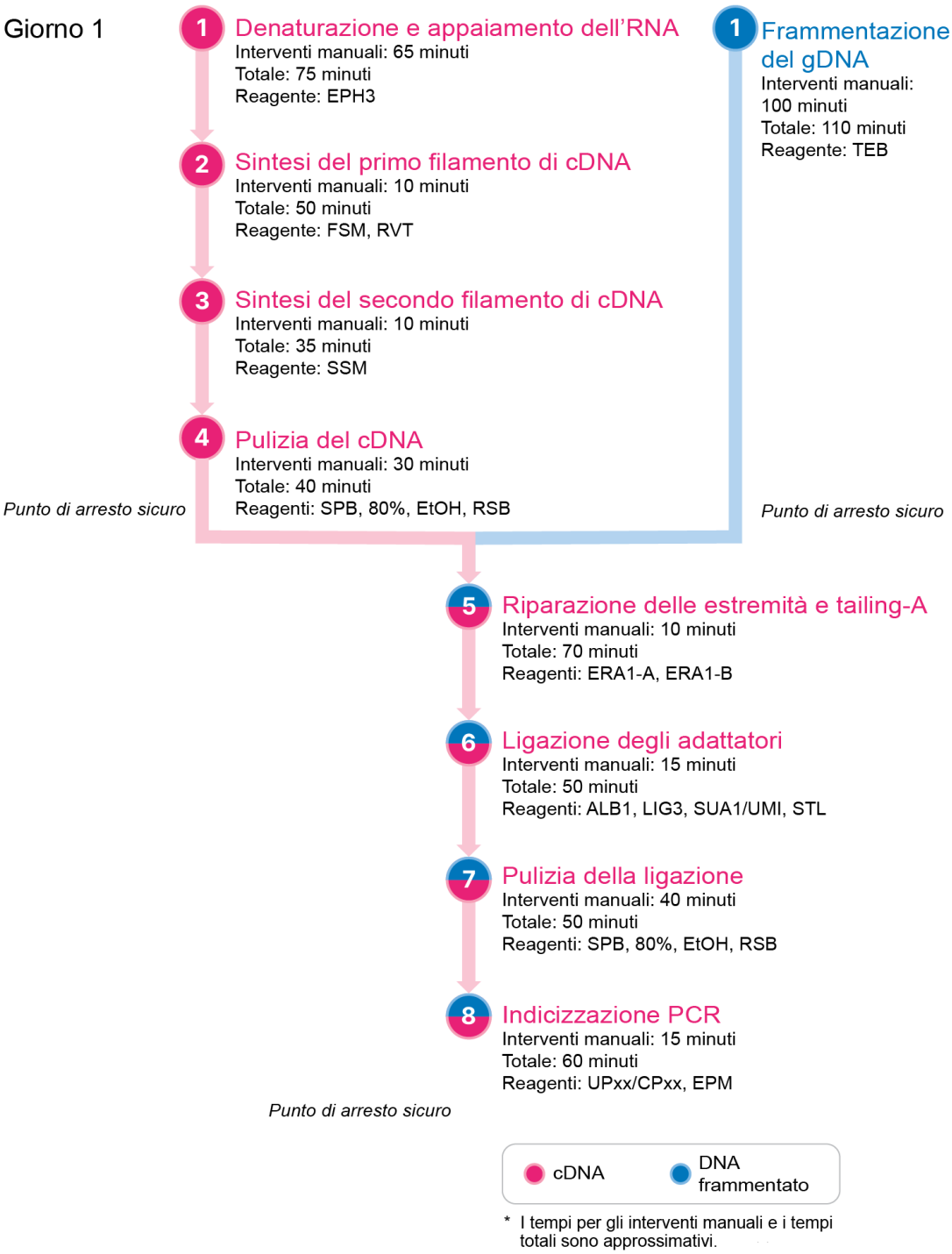
Una descrizione generale del flusso di lavoro TSO Comprehensive (UE) è mostrata nella Figura 1 e nella Figura 2.

Flusso di lavoro di preparazione delle librerie

Figura 1 illustra il flusso di lavoro per TSO Comprehensive (UE). Le librerie da campioni di RNA e DNA possono essere preparate simultaneamente in pozzetti separati. I controlli positivi e i controlli senza templato vengono elaborati in modo identico ai campioni. Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri.

Prima di avviare il protocollo, immettere le informazioni sulla corsa e sul campione in Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module. Consultare *Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661)*.

Figura 1 Flusso di lavoro TSO Comprehensive (UE) (Parte 1)

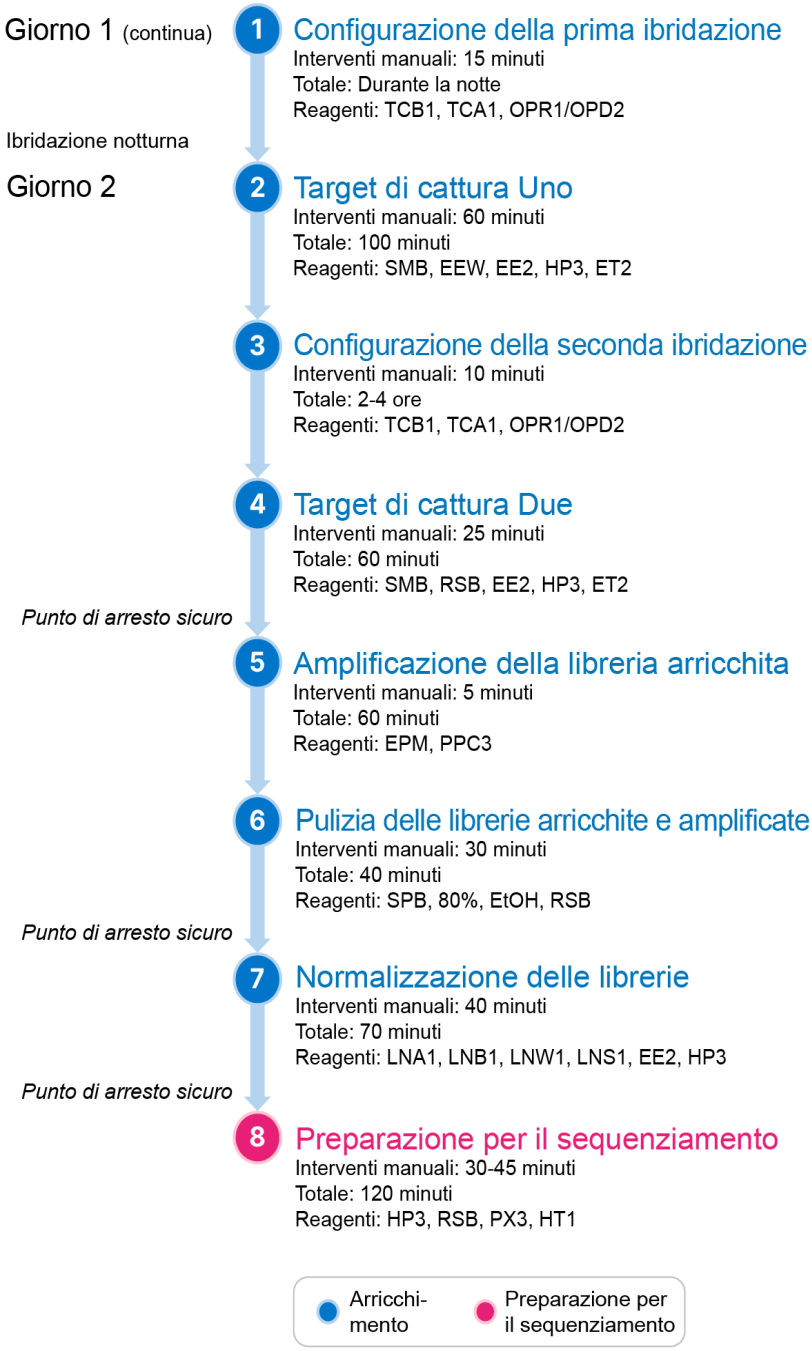


PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. SOLO PER L'ESPORTAZIONE.

Flusso di lavoro di arricchimento

La Figura 2 illustra il flusso di lavoro di arricchimento di TSO Comprehensive (UE). Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri.

Figura 2 Flusso di lavoro TSO Comprehensive (UE) (Parte 2)



PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO. SOLO PER L'ESPORTAZIONE.

Programmazione dei ciclatori termici

Prima di avviare il saggio, salvare i seguenti programmi sui ciclatori termici pre- e post-amplificazione.

Tabella 10 Programmi pre-amplificazione del ciclatore termico

Fase della procedura	Nome del programma	Temperatura del coperchio	Volume di reazione	Parametri del ciclatore termico
Denaturazione e appaiamento dell'RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C per 5 minuti • 4 °C per 1 minuto • Mantenere la temperatura a 4 °C
Sintesi del primo filamento di cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C per 10 minuti • 42 °C per 15 minuti • 70 °C per 15 minuti • 4 °C per 1 minuto • Mantenere la temperatura a 4 °C
Sintesi del secondo filamento di cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C per 25 minuti • 4 °C per 1 minuto • Mantenere la temperatura a 4 °C

NOTA Se la temperatura del coperchio per 2ndSS non potesse essere impostata su 30 °C, disattivare l'opzione di preriscaldamento del coperchio.

Tabella 11 Programmi post-amplificazione del ciclatore termico

Fase della procedura	Nome del programma	Temperatura del coperchio	Volume di reazione	Parametri del ciclatore termico

Indicizzazione PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C per 30 secondi
				• 15 cicli di:
				  • 98 °C per 10 secondi
				  • 60 °C per 30 secondi
				  • 72 °C per 30 secondi
				• 72 °C per 5 minuti
				• Mantenere la temperatura a 10 °C

Fase della procedura	Nome del programma	Temperatura del coperchio	Volume di reazione	Parametri del ciclatore termico
Esecuzione della prima ibridazione	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C per 10 minuti • 85 °C per 2 min 30 secondi • 75 °C per 2 min 30 secondi • 65 °C per 2 min 30 secondi • Mantenere la temperatura a 57 °C per un periodo da 8 a 24 ore
Esecuzione della seconda ibridazione	HYB2	100 °C	50 µl	• 95 °C per 10 minuti • 85 °C per 2 min 30 secondi • 75 °C per 2 min 30 secondi • 65 °C per 2 min 30 secondi • Mantenere la temperatura a 57 °C per un periodo da 1,5 a 4 ore

Amplificazione della libreria arricchita	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C per 30 s
				• 18 cicli di:
				  • 98 °C per 10 s
				  • 60 °C per 30 s
				  • 72 °C per 30 s
				• 72 °C per 5 min
				• Mantenere la temperatura a 10 °C

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

⚠ ATTENZIONE

Tutte le procedure del flusso di lavoro richiedono un ambiente privo di RNasi/DNasi.

1. Decontaminare accuratamente le aree di lavoro con un detergente inibitore di RNasi/DNasi.
2. Assicurarsi che i programmi di pre-amplificazione del ciclatore termico siano impostati. Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
3. Impostare il sonificatore a ultrasuoni secondo le istruzioni del produttore.
4. Se si elaborano solo campioni di DNA, passare direttamente alla fase *Frammentazione del gDNA* alla pagina 50.
5. Rimuovere i controlli RNA dal luogo deputato alla conservazione.
6. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (n. codice 20031127)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
EPH3	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Denaturazione e appaiamento dell'RNA
FSM	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Sintesi del primo filamento di cDNA
RVT	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Sintesi del primo filamento di cDNA
SSM	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Sintesi del secondo filamento di cDNA

Tabella 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (n. codice 20031119)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SPB (etichetta verde chiaro)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Pulizia del cDNA
RSB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Pulizia del cDNA

Denaturazione e appaiamento dell'RNA

Questo processo denatura l'RNA purificato e lo sottopone a priming con esameri casuali in preparazione della sintesi del cDNA.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - EPH3: mettere da parte.
   - FSM: miscelare tramite vortex. Centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare.
     Il reagente potrebbe contenere particolati bianchi correlati al prodotto. Non è richiesto alcun intervento da parte dell'utente. Non vi è alcun impatto sulle prestazioni del prodotto.
   - RVT: centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Conservare al freddo.

   NOTA RVT è una soluzione viscosa. Ridurre al minimo la formazione di bolle durante il pipettaggio.

2. Per preparare una miscela master FSM + RVT, combinare i seguenti volumi in una provetta da microcentrifuga.

Tabella 14 Master Mix FSM + RVT*

Componente miscela master	4 librerie (µl)	8 librerie (µl)	16 librerie (µl)	24 librerie (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare *Manipolazione dei reagenti* alla pagina 34.

3. Pipettare 10 volte per miscelare.
4. Conservare la miscela master FSM + RVT al freddo fino al momento della fase *Sintesi del primo filamento di cDNA* alla pagina 47.

Procedura

1. Conservare al freddo i campioni di RNA estratti e i controlli di RNA durante lo scongelamento.
   Per la parte restante del protocollo, elaborare i controlli di RNA come campioni.
2. Conservare l'RNA al freddo quando non è in uso. Per quantificare i campioni, consultare *Requisiti dei campioni* alla pagina 27.
3. Pipettare ogni campione di RNA 10 volte per miscelare.
4. Preparare 40 ng di ciascun campione di RNA in un volume finale di 8,5 µl (4,7 ng/µl) utilizzando RNase/DNase-free water.
   Per i controlli dell'RNA, utilizzare la concentrazione indicata sull'etichetta della provetta.
5. Apporre un'etichetta "CF" (Frammenti di cDNA) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
6. Aggiungere 8,5 µl di ciascun campione di RNA a un unico pozzetto della piastra CF PCR.
7. Durante la configurazione della corsa, assicurarsi che il layout della piastra campioni e gli indici di ogni campione corrispondano alla corsa pianificata in Modulo di analisi TSO Comprehensive (UE).
8. Miscelare EPH3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
9. Aggiungere 8,5 µl di EPH3 a ciascun pozzetto del campione.
10. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CF PCR.

    ⚠ ATTENZIONE

    Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.

11. Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.
12. Centrifugare a 280 × g per un minuto.
13. Posizionare sul ciclatore termico ed eseguire il programma LQ-RNA.
    Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
14. Quando i campioni raggiungono i 4 °C, attendere un minuto. Passare immediatamente alla fase successiva.

Sintesi del primo filamento di cDNA

Questo processo trascrive al contrario i frammenti di RNA sottoposti a priming con esameri casuali nel primo filamento di cDNA usando la reverse transcriptase.

Procedura

1. Rimuovere la piastra CF PCR dal ciclatore termico.
2. Pipettare 10 volte per miscelare la miscela master FSM + RVT. Assicurarsi che la miscela FSM + RVT sia completamente omogenea.
3. Aggiungere 8 µl di miscela master FSM + RVT a ciascun pozzetto del campione.
4. Pipettare 10 volte per miscelare.
5. Eliminare la miscela master FSM + RVT rimanente.
6. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CF PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
7. Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.
8. Centrifugare a 280 × g per un minuto.
9. Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma 1stSS.
   Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
10. Quando i campioni raggiungono i 4 °C, passare immediatamente alla fase successiva.
    I campioni del primo filamento possono essere tenuti a 4 °C per un massimo di cinque minuti.

Sintesi del secondo filamento di cDNA

Questo processo rimuove il modello di RNA e sintetizza il cDNA a doppio filamento.

Preparazione

1. Preparazione di SSM:
   a. Capovolgere 10 volte per miscelare.
   b. Centrifugare brevemente. Il reagente potrebbe contenere particolati bianchi correlati al prodotto. Non si richiede alcun intervento. Non vi è alcun impatto sulle prestazioni del prodotto.

Procedura

1. Rimuovere la piastra CF PCR dal ciclatore termico.
2. Aggiungere 25 µl di SSM a ciascun pozzetto del campione.
3. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CF PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
4. Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.

5. Centrifugare a 280 × g per un minuto.
6. Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma 2ndSS.
   Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
7. Quando i campioni raggiungono i 4 °C, attendere un minuto, quindi passare immediatamente alla fase successiva.

Pulizia del cDNA

Questo processo utilizza SPB per purificare il cDNA da componenti di reazione indesiderati. Le microsfere vengono lavate due volte con etanolo all'80% preparato al momento. Il cDNA viene eluito con RSB.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - SPB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
   - RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
2. Preparare al momento una soluzione all'80% di EtOH in una provetta conica da 15 o 50 ml.

   Tabella 15 Preparare al momento EtOH all'80%

Reagente	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie
100% etanolo puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Miscelare l'EtOH all'80% preparato al momento tramite vortex.
4. Apporre un'etichetta "BIND1" (legame di cDNA) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
5. Coprire e mettere da parte.
6. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Rimuovere la piastra CF PCR dal ciclatore termico.
2. Miscelare tramite vortex l'SPB per un minuto per risospendere le microsfere.
3. Aggiungere immediatamente 90 µl di SPB a ciascun pozzetto del campione della piastra BIND1 MIDI.
   Se si utilizzasse una vaschetta per dispensare SPB, includere un fattore in eccesso di 1,15 quando si aliquota sufficiente materiale per campione. Dopo aver aggiunto SPB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
4. Trasferire l'intero volume (50 µl) di ciascun campione dalla piastra CF PCR al pozzetto corrispondente della piastra BIND1 MIDI.
5. Eliminare la piastra CF PCR vuota.

6. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND1 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
7. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
8. Incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.
9. Posizionare la piastra BIND1 MIDI su un supporto magnetico per cinque minuti.
10. Mantenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
   a. Mantenere la piastra BIND1 MIDI sul supporto magnetico e aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di EtOH all'80% preparato al momento.
   b. Attendere 30 secondi.
   c. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
3. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'etanolo residuo da ciascun pozzetto.
4. Eliminare l'EtOH all'80% non utilizzato.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra BIND1 MIDI dal supporto magnetico.
2. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
3. Aggiungere 22 µl di RSB a ciascun pozzetto del campione.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND1 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
5. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
6. Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
8. Apporre un'etichetta "PCF" (frammenti di cDNA purificati) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
   Se ci si fermasse al *PUNTO DI ARRESTO SICURO* alla pagina 50, usare una piastra PCR.
9. Trasferire 20 µl di eluato da ogni pozzetto del campione della piastra BIND1 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra PCF.
10. Eliminare la piastra BIND1 MIDI vuota.
11. Aggiungere 30 µl di RSB a ciascun pozzetto del campione della piastra PCF.
12. Pipettare 10 volte per mescolare.
13. Applicare il sigillo adesivo alla piastra PCF e tenerla al freddo.

14. Riportare EPH3, FSM, RVT e SSM nel luogo deputato alla conservazione.
15. Se si stessero elaborando solo campioni derivati da RNA (cDNA) e non ci si ferma al punto di arresto sicuro, procedere con la fase *Riparazione delle estremità e tailing-A* alla pagina 53.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se fosse necessario fermarsi, centrifugare la piastra PCF PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 7 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

1. Rimuovere i controlli DNA dal luogo deputato alla conservazione.
2. Rimuovere la provetta di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (n. codice 20031119)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TEB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Frammentazione del gDNA

Frammentazione del gDNA

Questo processo frammenta il gDNA e genera frammenti di dsDNA con estremità sporgenti al 3’ o al 5’.

Preparazione

1. Seguire le raccomandazioni in *Estrazione, quantificazione e conservazione dell’acido nucleico* alla pagina 28 per quantificare i campioni.
2. Preparare TEB: invertire o miscelare tramite vortex.

Procedura

Preparare la piastra

Selezionare una delle seguenti opzioni per preparare la piastra:

- Elaborare i campioni di gDNA contemporaneamente ai campioni di cDNA nella piastra PCF MIDI.
  a. Apporre un’etichetta “LP” (Preparazione delle librerie) alla piastra PCF MIDI.
  b. Conservarla al freddo e metterla da parte per utilizzarla nel passaggio *Trasferimento del DNA frammentato* alla pagina 52.
- Elaborare i campioni di gDNA contemporaneamente ai campioni di cDNA e la piastra PCF PCR è congelata.
  a. Scongelare la piastra PCF PCR a temperatura ambiente.

b. Centrifugare a 280 × g per un minuto.
c. Pipettare 10 volte per miscelare.
d. Apporre un'etichetta "LP" (Preparazione delle librerie) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
e. Trasferire tutti i 50 µl di ciascun campione dalla piastra PCF PCR al pozzetto corrispondente della piastra LP MIDI.
f. Eliminare la piastra PCF PCR.
g. Applicare il sigillo adesivo alla piastra e conservarla al freddo fino al *Trasferimento del DNA frammentato* alla pagina 52.

- Elaborare solo campioni di gDNA.
  a. Apporre un'etichetta "LP" (Preparazione delle librerie) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti. Se ci si ferma al *PUNTO DI ARRESTO SICURO* alla pagina 52, usare una piastra PCR.
  b. Coprirla e metterla da parte per utilizzarla nel passaggio *Trasferimento del DNA frammentato* alla pagina 52.

Diluizione del gDNA

1. Scongelare i campioni di gDNA e i controlli del DNA a temperatura ambiente.
2. Pipettare ogni campione di gDNA 10 volte per miscelare.
3. Centrifugare brevemente la provetta per raccogliere le goccioline.
4. Invertire o miscelare tramite vortex il TEB.
5. Utilizzare il TEB per preparare ogni campione di gDNA in un volume finale di 52 µl. Consultare la tabella seguente per le quantità di input e le concentrazioni minime in base al tipo di campione.
   - Il saggio richiede una concentrazione minima di estrazione per consentire almeno 40 µl di TEB dei 52 µl di volume.
   - Per i controlli del DNA, utilizzare la concentrazione indicata sull'etichetta della provetta.
   - Per evitare perdite di campione, non pipettare meno di 2 µl di campione in questa diluizione.

Tipo di campione	Quantità di input (ng)	Concentrazione minima (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Controllo	40	Consultare l'etichetta della provetta

Frammentazione

1. Aggiungere 52 µl di ciascun campione di gDNA in un distinto pozzetto della provetta del sonificatore a ultrasuoni.

⚠ ATTENZIONE

Caricare il gDNA nella provetta lentamente, evitando la formazione di vuoti d'aria sul fondo. Per ulteriori informazioni, consultare *Saggio* alla pagina 30 e le istruzioni del produttore.

2. Prendere nota dell'orientamento della striscia.
3. Frammentare il gDNA in frammenti con il sonificatore a ultrasuoni.

Trasferimento del DNA frammentato

1. Assicurarsi che il layout della piastra del campione e gli indici per ogni campione corrispondano alla corsa selezionata per l'analisi con Modulo di analisi TSO Comprehensive (UE).
2. Per recuperare il campione, seguire le istruzioni del produttore del sonificatore a ultrasuoni.
   Per alcuni tipi di provette del sonificatore a ultrasuoni, potrebbe essere richiesto di eseguire la centrifugazione per consolidare il campione all'interno.
3. Per ogni campione di gDNA frammentato, utilizzare una pipetta con punte fini per eseguire tre trasferimenti di 16,7 µl in un pozzetto vuoto della piastra LP MIDI.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP MIDI.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se fosse necessario fermarsi, applicare un sigillo adesivo alla piastra LP PCR e centrifugare a 280 × g per un minuto. Conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 7 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

Assicurarsi che i programmi di post-amplificazione del ciclatore termico siano impostati. Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.

1. Preparare un portaghiaccio o prodotto equivalente.
2. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (n. codice 20031118)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
ERA1-A	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Riparazione delle estremità e tailing-A
ERA1-B	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Riparazione delle estremità e tailing-A
ALB1	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
LIG3	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Ligazione degli adattatori

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SUA1 (tappo blu)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
UMI (tappo bianco)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
STL	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Ligazione degli adattatori
EPM	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Indicizzazione PCR

Tabella 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (n. codice 20031119)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SPB (etichetta verde chiaro)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Pulizia della ligazione
RSB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Pulizia della ligazione

Tabella 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (n. codice 20031120)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
UPxx	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare le provette di index primer appropriate a temperatura ambiente.	Indicizzazione PCR

Tabella 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (n. codice 20031126)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
CPxx	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare le provette di index primer appropriate a temperatura ambiente.	Indicizzazione PCR

Riparazione delle estremità e tailing-A

Questo processo ripara le estremità sporgenti risultanti dalla frammentazione trasformandole in estremità con coda A sporgente usando una miscela master end repair A-tailing (ERA1).

L'attività esonucleasica dal 3' al 5' di questo mix rimuove le estremità sporgenti al 3', mentre l'attività della polimerasi dal 5' al 3' riempie le estremità sporgenti al 5'. Durante questa reazione, le estremità 3' presentano coda A per impedire che si leghino a vicenda durante la reazione di ligazione dell'adattatore.

Preparazione

1. Preriscaldare due incubatori per microcampioni con inserti di blocco termico MIDI nel modo descritto di seguito.
   - Preriscaldare un incubatore per microcampioni a 30 °C.
   - Preriscaldare un incubatore per microcampioni a 72 °C.
2. Preparare i seguenti reagenti:
   - ERA1-A: centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Conservare al freddo.
   - ERA1-B: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
     Verificare la presenza di precipitati. Se presenti, scaldare la provetta a 37 °C, quindi pipettare per miscelare fino al dissolvimento dei precipitati.
3. Preparare la miscela master ERA1 in una provetta da microcentrifuga.

   Tabella 21 Master Mix ERA1*

Componente miscela master	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
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

   *Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare *Manipolazione dei reagenti* alla pagina 34.
4. Pipettare lentamente 10 volte per garantire l'omogeneità, quindi centrifugare brevemente. Conservare al freddo la miscela master ERA1.
5. Selezionare una delle seguenti opzioni per preparare la piastra:
   - Se i campioni si trovano in una piastra MIDI, preparare come segue.
     a. Rietichettare la piastra MIDI con l'indicazione "LP2" (Preparazione delle librerie 2).
     b. Se alcuni campioni sono in piastre MIDI separate, spostare tutti i campioni in pozzetti separati della stessa piastra MIDI in base al layout della piastra.
   - Se la piastra è congelata, prepararla come segue.
     a. Scongelare la piastra PCF PCR o la piastra LP PCR a temperatura ambiente.
     b. Centrifugare la piastra a 280 × g per un minuto.
     c. Pipettare 10 volte per miscelare.
     d. Apporre un'etichetta "LP2" (Preparazione delle librerie 2) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
     e. Trasferire tutti i 50 µl di ciascun campione dalla piastra PCF PCR o dalla piastra LP PCR al pozzetto corrispondente della piastra LP2 MIDI.
     f. Eliminare la piastra PCF PCR o LP PCR.

Procedura

1. Aggiungere 10 µl di miscela master ERA1 a ciascun pozzetto della piastra LP2 MIDI.
2. Eliminare la miscela master ERA1 rimanente.
3. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
4. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
5. Incubare nell'incubatore per microcampioni preriscaldato a 30 °C per 30 minuti.
6. Trasferire immediatamente in un secondo incubatore per microcampioni preriscaldato.
7. Incubare a 72 °C per 20 minuti.
8. Conservare la piastra LP2 MIDI al freddo per 5 minuti.

Ligazione degli adattatori

Questo processo lega gli adattatori alle estremità dei frammenti di cDNA e/o gDNA.

Il saggio TSO Comprehensive (UE) include adattatori SUA1 e adattatori UMI.

- Per i campioni di RNA, utilizzare gli adattatori SUA1.
- Per i campioni di DNA, utilizzare gli adattatori UMI.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - ALB1: miscelare tramite vortex per almeno 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
   - LIG3: centrifugare brevemente, quindi pipettare per miscelare. Conservare al freddo.
   - SUA1: miscelare tramite vortex per almeno 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
   - UMI: miscelare tramite vortex per almeno 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
   - STL: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.

Procedura

1. Rimuovere la piastra LP2 MIDI dal ghiaccio o materiale equivalente.
2. Aggiungere 60 µl di ALB1 a ciascun pozzetto del campione della piastra LP2 MIDI. ALB1 è una soluzione viscosa. Pipettare lentamente per ridurre al minimo la formazione di bolle.
3. Aggiungere 5 µl di LIG3 a ciascun pozzetto del campione.
4. Aggiungere gli adattatori come segue.
   Non combinare diversi tipi di adattatore.
   - **[Pozzetti campione di RNA]**: aggiungere 10 µl di SUA1 (tappo blu) per ogni campione derivato da RNA.

- **[Pozzetti campione di DNA]**: aggiungere 10 µl di UMI (tappo bianco) per ogni campione derivato da DNA.

5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
7. Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.
8. Miscelare l'STL tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
9. Aggiungere 5 µl di STL a ciascun pozzetto del campione della piastra LP2 MIDI.
10. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
    Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
11. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.

Pulizia della ligazione

Questo processo utilizza SPB per purificare i frammenti di cDNA o gDNA legati all'adattatore e rimuovere i prodotti indesiderati. Le microsfere vengono lavate due volte con etanolo all'80% preparato al momento. I campioni legati all'adattatore vengono eluiti con RSB.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - SPB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
   - RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
2. Preparare al momento una soluzione all'80% di EtOH in una provetta conica da 15 o 50 ml.

   Tabella 22 Preparare al momento etanolo all'80%

Reagente	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
100% etanolo puro	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. Miscelare l'EtOH all'80% preparato al momento tramite vortex.
4. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Miscelare tramite vortex l'SPB per un minuto per risospendere le microsfere.
2. Aggiungere immediatamente 112 µl di SPB a ciascun pozzetto del campione nella piastra LP2 MIDI.

Se si utilizzasse una vaschetta per dispensare SPB, includere un fattore in eccesso di 1,15 quando si aliquota sufficiente materiale per campione. Dopo aver aggiunto SPB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.

3. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
4. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
5. Incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.
6. Posizionare la piastra LP2 MIDI sul supporto magnetico per 10 minuti.
7. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
   a. Tenere la piastra LP2 MIDI sul supporto magnetico e aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di EtOH all'80% preparato al momento.
   b. Attendere 30 secondi.
   c. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
3. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'etanolo residuo da ciascun pozzetto.
4. Eliminare l'EtOH all'80% non utilizzato.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra LP2 MIDI dal supporto magnetico.
2. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
3. Aggiungere 27,5 µl di RSB a ciascun pozzetto del campione.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LP2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
5. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
6. Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
7. Posizionare la piastra LP2 MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
8. Apporre un'etichetta "LS" (Campioni di libreria) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Trasferire 25 µl di ogni eluato dalla piastra LP2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra LS PCR.
10. Eliminare la piastra LP2 MIDI vuota.

Indicizzazione PCR

In questa fase, i frammenti della libreria vengono amplificati utilizzando primer che aggiungono sequenze di indice per il multiplex campioni. Il prodotto risultante contiene la libreria completa di cDNA e/o frammenti di DNA affiancati da adattatori necessari per la generazione di cluster.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - EPM: mantenere al freddo.
   - UPxx: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. UPxx è l'index primer selezionato nella schermata Create Run (Crea corsa) nel software Local Run Manager durante la configurazione della corsa.
   - CPxx: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. CPxx è l'index primer selezionato nella schermata Create Run (Crea corsa) nel software Local Run Manager durante la configurazione della corsa.
2. Assicurarsi che gli indici per ciascun campione corrispondano alla corsa pianificata in Modulo di analisi TSO Comprehensive (UE) durante la configurazione della corsa. Assicurarsi di seguire le istruzioni relative alla selezione dell'indice in *Numero delle librerie e selezione degli indici* alla pagina 36.

   ⚠ ATTENZIONE

   Le discordanze tra campioni e index primer causano la segnalazione di risultati errati a causa della perdita dell'identificazione positiva del campione.

Procedura

1. Aggiungere 5 µl dell'index primer appropriato (UPxx o CPxx) al pozzetto del campione corrispondente nella piastra LS PCR in base agli indici selezionati.

   ⚠ ATTENZIONE

   Maneggiare e aprire solo una provetta di index primer alla volta. Richiudere ogni provetta di indice con un tappo nuovo immediatamente dopo l'uso. Non combinare gli index primer tra loro.

2. Miscelare l'EPM tramite vortex per 5 secondi, quindi centrifugare brevemente.
3. Aggiungere 20 µl di EPM a ciascun pozzetto del campione.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra LS PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
5. Agitare a 1.200 giri/min per un minuto.
6. Ricollocare i reagenti di pre-amplificazione nel luogo deputato alla conservazione.

⚠ ATTENZIONE

Eseguire tutti i passaggi successivi in un'area post-amplificazione per evitare il carry-over del prodotto dell'amplificazione.

7. Centrifugare la piastra LS PCR a 280 × g per un minuto.
8. Posizionare sul ciclatore termico post amplificazione preprogrammato ed eseguire il programma I-PCR. Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
   Se si prosegue con la fase di *Configurazione della prima ibridazione* alla pagina 60, seguire le istruzioni di scongelamento nella sezione Preparazione delle fasi del protocollo.
9. Al termine del programma I-PCR, centrifugare la piastra LS PCR a 280 × g per un minuto.
10. Rietichettare la piastra apponendo l'indicazione "ALS" (Campioni di libreria amplificati).

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se fosse necessario fermarsi, conservare la piastra ALS PCR a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono l'ibridazione durante la notte.

1. Assicurarsi che i programmi di post-amplificazione del ciclatore termico siano impostati. Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
2. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TCB1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Tabella 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
TCA1	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Tabella 25 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n. codice 20031122)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
OPR1 (tappo rosso)	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione
OPD2 (tappo bianco)	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Configurazione della prima ibridazione

Configurazione della prima ibridazione

Durante questo processo, un pool di oligonucleotidi si ibrida alle librerie di cDNA e un pool di oligonucleotidi si ibrida alle librerie di gDNA preparate nella fase *Indicizzazione PCR* alla pagina 58. L'arricchimento di regioni mirate richiede due fasi di ibridazione. Nella prima ibridazione, gli oligonucleotidi si ibridano alle librerie cDNA e/o gDNA durante la notte (da 8 ore a 24 ore).

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - TCB1: scaldare la provetta a 37 °C per cinque minuti. Miscelare tramite vortex per 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.

- TCA1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- OPR1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
- OPD2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

2. Se la piastra ALS PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare a 280 × g per un minuto. Pipettare per miscelare.
3. Apporre un'etichetta "HYB1" (Ibridazione 1) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.

Procedura

1. Trasferire 20 µl di ciascuna libreria cDNA e/o gDNA dalla piastra ALS PCR al pozzetto corrispondente della piastra HYB1 PCR.
2. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ALS PCR e metterla da parte.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
3. Verificare che non siano presenti precipitati nel TCB1. Se presenti, scaldare nuovamente la provetta e agitarla tramite vortex fino a far dissolvere i cristalli.
4. Aggiungere 15 µl di TCB1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra HYB1 PCR.
5. Aggiungere 10 µl di TCA1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra HYB1 PCR.
6. Aggiungere le sonde.
   Non combinare diversi tipi di sonde. Aggiungere un solo set di sonde per pozzetto.
   - **[Pozzetti della libreria di RNA]**: aggiungere 5 µl di OPR1 (tappo rosso) a ogni libreria derivata dall'RNA.
   - **[Pozzetti della libreria di DNA]**: aggiungere 5 µl di OPD2 (tappo bianco) a ogni libreria derivata dal DNA.
7. Applicare il sigillo adesivo alla piastra HYB1 PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
8. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
9. Posizionare sul ciclatore termico ed eseguire il programma HYB1.
   Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
10. Ibridare a 57 °C per un minimo di 8 ore e fino a un massimo di 24 ore.
11. Ricollocare i reagenti di ibridazione nel luogo deputato alla conservazione.
12. Conservare la piastra ALS PCR a una temperatura compresa tra-25 °C e-15 °C per un massimo di 30 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

All'inizio del secondo giorno, rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SMB (etichetta blu scuro)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Target di cattura Uno Target di cattura Due
ET2	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due
HP3	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due Normalizzazione delle librerie
TCB1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione
RSB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Target di cattura Due Pulizia delle librerie arricchite e amplificate

Tabella 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
EE2	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno Target di cattura Due Normalizzazione delle librerie
EEW	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Target di cattura Uno
TCA1	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione

Tabella 28 TruSight Oncology Comp Content Set Box (n. codice 20031122)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
OPR1 (tappo rosso)	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione
OPD2 (tappo bianco)	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Configurazione della seconda ibridazione

Target di cattura Uno

Questa fase utilizza SMB per catturare le sonde ibridate sulle regioni di interesse target. Le microsfere vengono lavate tre volte con EEW. Le librerie arricchite vengono eluite utilizzando una miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento e neutralizzata con ET2.

Preparazione

1. Preriscaldare un incubatore per microcampioni con un inserto di blocco termico MIDI a 57 °C.
2. Preparare i seguenti reagenti:
   - EEW: miscelare tramite vortex per un minuto.
   - EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
   - HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
   - SMB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
     Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare **SMB** e non SPB.
   - ET2: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
3. Preparare al momento la miscela di eluizione EE2 + HP3 in una provetta per microcentrifuga.

   Tabella 29 Miscela di eluizione EE2 + HP3 per target di cattura Uno*

Componente della miscela di eluizione	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1.368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

   *Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare *Manipolazione dei reagenti* alla pagina 34.
4. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2 + HP3, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per il passaggio della *Eluizione* alla pagina 64.
5. Apporre un'etichetta "CAP1" (Cattura 1) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
6. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Rimuovere la piastra HYB1 PCR dal ciclatore termico.
2. Centrifugare la piastra HYB1 PCR a 280 × g per un minuto.
3. Miscelare tramite vortex l'SMB per un minuto per risospendere le microsfere.
   Se sono presenti precipitato o pellet di microsfere, assicurarsi di raggiungere la temperatura ambiente, pipettare in alto e in basso per rilasciare il pellet, quindi miscelare tramite vortex per risospenderlo.
4. Aggiungere immediatamente 150 µl di SMB a ciascun pozzetto della libreria della piastra CAP1 MIDI.
   Se per dispensare SMB si utilizzano vaschette, includere un fattore di eccesso di 1,15 quando si aliquota sufficiente materiale per campione.
5. Dopo aver aggiunto SMB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
6. Impostare la pipetta a 50 µl e trasferire l'intero volume di ciascuna libreria dalla piastra HYB1 PCR al pozzetto corrispondente della piastra CAP1 MIDI.
7. Eliminare la piastra HYB1 PCR vuota.

8. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
9. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
10. Incubare nell'incubatore per microcampioni preriscaldato a 57 °C per 25 minuti.
11. Posizionare la piastra CAP1 MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
12. Mantenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

⚠ ATTENZIONE

Andare immediatamente al passaggio successivo (*Lavaggio* alla pagina 64). Non lasciare il pellet di microsfere a riposo per un periodo di tempo eccessivo senza la presenza di liquido.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
   a. Rimuovere la piastra CAP1 MIDI dal supporto magnetico.
   b. Aggiungere 200 µl di EEW a ciascun pozzetto.
   c. Impostare il volume della pipetta su 150 µl e pipettare almeno 10 volte per mescolare. Assicurarsi che tutte le microsfere siano risospese.
      Assicurarsi che non siano presenti pellet di microsfere; per farlo, aspirare attentamente la soluzione totale di microsfere del pozzetto nella punta. Ispezionare visivamente il fondo di ciascun pozzetto. Se fosse presente un pellet di microsfere, disporre ad angolo la punta della pipetta verso il pellet durante le fasi di lavaggio per farlo fuoriuscire. Assicurarsi che il pellet di microsfere sia completamente immerso in soluzione. La soluzione deve avere un aspetto marrone scuro e una consistenza omogenea.
   d. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.
   e. Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
   f. Agitare a 1.800 giri/min per quattro minuti.
   g. Incubare in un incubatore per microcampioni a 57 °C per cinque minuti.
   h. Posizionare la piastra CAP1 MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
   i. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
3. Lavare le microsfere una **terza** volta.
4. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'EEW residuo da ciascun pozzetto.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra CAP1 MIDI dal supporto magnetico.

2. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
3. Aggiungere 17 µl di miscela di eluizione EE2 + HP3 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra CAP1 MIDI.
4. Eliminare la miscela di eluizione EE2 + HP3 rimanente.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP1 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
8. Apporre un'etichetta "ELU1" (Eluizione 1) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Miscelare l'ET2 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
10. Aggiungere 5 µl di ET2 a ciascun pozzetto della libreria corrispondente nella nuova piastra ELU1 PCR.
11. Trasferire con attenzione 15 µl di eluato da ogni pozzetto della libreria della piastra CAP1 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra ELU1 PCR.
12. Eliminare la piastra CAP1 MIDI vuota.
13. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU1 PCR.
    Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
14. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
15. Riportare l'EEW nel luogo deputato alla conservazione.

Configurazione della seconda ibridazione

Questo passaggio lega le regioni target delle librerie cDNA e/o gDNA arricchite alle sonde di cattura una seconda volta. La seconda ibridazione assicura un'alta specificità delle regioni catturate. Per garantire un arricchimento ottimale delle librerie, eseguire la seconda fase di ibridazione a 57 °C per un minimo di 1,5 ore e fino a un massimo di 4 ore.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - TCB1: scaldare la provetta a 37 °C per cinque minuti. Miscelare tramite vortex per 10 secondi, quindi centrifugare brevemente.
   - TCA1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
   - OPR1: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
   - OPD2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

Procedura

1. Verificare che non siano presenti precipitati nel TCB1. Se presenti, scaldare nuovamente la provetta e miscelarla tramite vortex fino a far dissolvere i cristalli.

2. Aggiungere 15 µl di TCB1 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra ELU1 PCR.
3. Aggiungere 10 µl di TCA1 a ciascun pozzetto della libreria.
4. Aggiungere la stessa sonda utilizzata durante la prima ibridazione a ciascun pozzetto. Aggiungere un solo set di sonde per pozzetto.
   Non combinare diversi tipi di sonde.
   - **[Pozzetti della libreria di RNA]**: aggiungere 5 µl di OPR1 (tappo rosso) a ogni libreria derivata dall'RNA.
   - **[Pozzetti della libreria di DNA]**: aggiungere 5 µl di OPD2 (tappo bianco) a ogni libreria derivata dal DNA.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU1 PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
6. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
7. Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma HYB2.
   Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
8. Ibridare a 57 °C per un minimo di 1.5 ore e fino a un massimo di 4 ore.
9. Ricollocare i reagenti di ibridazione nel luogo deputato alla conservazione.

Target di cattura Due

Questa fase utilizza SMB per catturare le sonde ibridate sulle regioni di interesse target. Le microsfere vengono lavate una volta con RSB. Le librerie arricchite vengono eluite utilizzando una miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento e neutralizzata con ET2.

Preparazione

1. Preriscaldare un incubatore per microcampioni con inserto di blocco termico MIDI a 57 °C.
2. Preparare i seguenti reagenti:
   - EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
   - HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
   - SMB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
     Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare **SMB** e non SPB.
   - RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
   - ET2: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
3. Preparare al momento la miscela di eluizione EE2 + HP3 in una provetta per microcentrifuga.

Tabella 30 Miscela di eluizione EE2 + HP3 per target di cattura Due*

Componente della miscela di eluizione	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1.368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare *Manipolazione dei reagenti* alla pagina 34.

4. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per il passaggio *Eluizione* alla pagina 68.
5. Apporre un'etichetta "CAP2" (Cattura 2) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
6. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Rimuovere la piastra ELU1 PCR dal ciclatore termico.
2. Centrifugare la piastra ELU1 PCR a 280 × g per un minuto.
3. Miscelare tramite vortex l'SMB per un minuto per risospendere le microsfere.
   Se sono presenti precipitato o pellet di microsfere, assicurarsi di raggiungere la temperatura ambiente, pipettare in alto e in basso per rilasciare il pellet, quindi miscelare tramite vortex per risospenderlo.
4. Aggiungere immediatamente 150 µl di SMB a ciascun pozzetto della libreria della piastra CAP2 MIDI.
   Se per dispensare SMB si utilizzano vaschette, includere un fattore di eccesso di 1,15 quando si aliquota sufficiente materiale per campione.
5. Dopo aver aggiunto SMB a ogni pozzetto del campione, eliminare il materiale rimanente.
6. Impostare la pipetta a 50 µl e trasferire l'intero volume di ciascuna libreria dalla piastra ELU1 PCR al pozzetto corrispondente della piastra CAP2 MIDI.
7. Eliminare la piastra ELU1 PCR vuota.
8. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
9. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
10. Incubare in un incubatore per microcampioni a 57 °C per 25 minuti.
    Se si prosegue con *Amplificazione della libreria arricchita* alla pagina 70, seguire le istruzioni di scongelamento dei reagenti nella sezione Preparazione del protocollo.
11. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
12. Tenere la piastra CAP2 MIDI sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

> ⚠ ATTENZIONE
>
> Andare immediatamente al passaggio successivo (*Lavaggio* alla pagina 67). Non lasciare il pellet di microsfere a riposo per un periodo di tempo eccessivo senza la presenza di liquido.

Lavaggio

1. Rimuovere la piastra CAP2 MIDI dal supporto magnetico.
2. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.

3. Aggiungere 200 µl di RSB a ciascun pozzetto.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
5. Agitare a 1.800 giri/min per quattro minuti.
6. Posizionare la piastra sul supporto magnetico per due minuti.
7. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
8. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'RSB residuo da ciascun pozzetto.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra CAP2 MIDI dal supporto magnetico.
2. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
3. Aggiungere 22 µl di miscela di eluizione EE2 + HP3 a ciascun pozzetto della libreria nella piastra CAP2 MIDI.
4. Eliminare la miscela di eluizione EE2 + HP3 rimanente.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra CAP2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
8. Apporre un'etichetta "ELU2" (Eluizione 2) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Miscelare l'ET2 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
10. Aggiungere 5 µl di ET2 a ciascun pozzetto della libreria corrispondente nella nuova piastra ELU2 PCR.
11. Trasferire con attenzione 20 µl di eluato da ogni pozzetto della libreria della piastra CAP2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra ELU2 PCR.
12. Eliminare la piastra CAP2 MIDI vuota.
13. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU2 PCR.
    Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
14. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
15. Riportare SMB, EE2, HP3, RSB e ET2 nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se fosse necessario fermarsi, centrifugare la piastra ELU2 PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 7 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

1. Preparare un portaghiaccio o prodotto equivalente.
2. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
PPC3	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Amplificazione della libreria arricchita
EPM	Tra -25 °C e -15 °C	Conservare al freddo.	Amplificazione della libreria arricchita

Tabella 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
SPB (etichetta verde chiaro)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Pulizia delle librerie arricchite e amplificate
RSB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Pulizia delle librerie arricchite e amplificate Preparazione per il sequenziamento

Amplificazione della libreria arricchita

Tramite questo passaggio vengono utilizzati i primer per amplificare le librerie arricchite.

Preparazione

1. Se la piastra ELU2 fosse stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare a 280 × g per un minuto.

Procedura

1. Miscelare il PPC3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
2. Aggiungere 5 µl di PPC3 a ciascun pozzetto della libreria della piastra ELU2 PCR.
3. Miscelare l'EPM tramite vortex per 5 secondi, quindi centrifugare brevemente.
4. Aggiungere 20 µl di EPM a ciascun pozzetto della libreria.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra ELU2 PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
6. Agitare a 1.200 giri/min per due minuti.
7. Posizionare su un ciclatore termico ed eseguire il programma EL-PCR.
   Consultare *Programmazione dei ciclatori termici* alla pagina 43.
   Se si prosegue con *Normalizzazione delle librerie* alla pagina 73, seguire le istruzioni di scongelamento nella sezione Preparazione del protocollo.
8. Riportare PPC3 ed EPM nel luogo deputato alla conservazione.

Pulizia delle librerie arricchite e amplificate

In questa fase si utilizza SPB per purificare le librerie arricchite da componenti di reazione indesiderati. Le microsfere vengono lavate due volte con etanolo all'80% preparato al momento. Le librerie vengono eluite con RSB.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - SPB: verificare che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti. Per questa procedura, assicurarsi di utilizzare l'**SPB** e non l'SMB.
   - RSB: mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
2. Preparare al momento una soluzione all'80% di etanolo in una provetta conica da 15 o 50 ml.

Tabella 33 Preparare al momento etanolo all'80%

Reagente	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
100% etanolo puro	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. Miscelare l'EtOH all'80% preparato al momento tramite vortex.
4. Apporre un'etichetta "BIND2" (Legame di pulizia) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
5. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Rimuovere la piastra ELU2 PCR dal ciclatore termico.
2. Centrifugare la piastra ELU2 PCR a 280 × g per un minuto.
3. Miscelare tramite vortex l'SPB per un minuto per risospendere le microsfere.
4. Aggiungere immediatamente 110 µl di SPB a ciascun pozzetto della libreria della piastra BIND2 MIDI.
5. Trasferire 50 µl di ciascuna libreria dalla piastra ELU2 PCR al pozzetto corrispondente della piastra BIND2 MIDI.
6. Eliminare la piastra ELU2 PCR vuota.
7. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
8. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
9. Incubare a temperatura ambiente per cinque minuti.
10. Posizionare la piastra BIND2 MIDI su un supporto magnetico per cinque minuti.
11. Mantenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
   a. Mantenere la piastra BIND2 MIDI sul supporto magnetico e aggiungere a ciascun pozzetto 200 µl di EtOH all'80% preparato al momento.
   b. Attendere 30 secondi.
   c. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
3. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere ed eliminare l'etanolo residuo da ciascun pozzetto.

4. Eliminare l'EtOH all'80% non utilizzato.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra BIND2 MIDI dal supporto magnetico.
2. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
3. Aggiungere 32 µl di RSB a ciascun pozzetto della libreria.
4. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BIND2 MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
5. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
6. Incubare a temperatura ambiente per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
8. Apporre un'etichetta "PL" (Librerie purificate) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Trasferire 30 µl di ogni eluato dalla piastra BIND2 MIDI al pozzetto corrispondente della piastra PL PCR.
10. Eliminare la piastra BIND2 MIDI vuota.
11. Applicare il sigillo adesivo alla piastra PL PCR.
12. Riportare l'SPB e l'RSB nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se fosse necessario fermarsi, centrifugare la piastra PL PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il successivo punto di arresto sicuro.

1. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
LNA1	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie
EE2	Tra-25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie

Tabella 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
LNB1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente per 30 minuti.	Normalizzazione delle librerie
HP3	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie Preparazione per il sequenziamento
LNW1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie
LNS1	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Normalizzazione delle librerie

2. Se si proseguisse lo stesso giorno con il passaggio *Preparazione per il sequenziamento* alla pagina 77, seguire le istruzioni di scongelamento nella sezione Preparazione del protocollo.

Normalizzazione delle librerie

Questo processo utilizza l'LNB1 più additivi (LNA1) per normalizzare la quantità di ciascuna libreria così da garantire una rappresentazione uniforme della libreria nelle librerie raggruppate. Le microsfere vengono lavate due volte con l'LNW1. Le librerie vengono eluite con una miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento e neutralizzate con l'LNS1.

Preparazione

1. Preparare i seguenti reagenti:
   - LNB1: assicurarsi che le microsfere siano rimaste a temperatura ambiente per 30 minuti.
   - LNA1: miscelare tramite vortex.
   - EE2: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
   - HP3: miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
   - LNW1: miscelare tramite vortex. Mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
   - LNS1: miscelare tramite vortex. Mettere da parte per utilizzarlo durante la procedura.
2. Miscelare tramite vortex l'LNB1 per un minuto per risospendere le microsfere.
   Invertire la provetta dell'LNB1 per assicurarsi che tutte le microsfere siano risospese.
3. Utilizzando una pipetta impostata su 800 µl, pipettare l'LNB1 su e giù 10 volte per garantire la risospensione.
4. Preparare al momento una miscela master di LNA1 + LNB1 e inserirla immediatamente in una provetta conica.

⚠ ATTENZIONE

Risospendere completamente il pellet di microsfere LNB1 sul fondo della provetta per evitare una densità dei cluster non coerente.

Tabella 36 Miscela master LNA1 + LNB1*

Componente miscela master	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
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

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare *Manipolazione dei reagenti* alla pagina 34.

5. Miscelare tramite vortex la miscela master LNA1 + LNB1. Mettere da parte per il passaggio *Legame* alla pagina 74.
6. Preparare al momento la miscela di eluizione EE2 + HP3 in una provetta per microcentrifuga.

Tabella 37 Miscela di eluizione EE2 + HP3 per la normalizzazione delle librerie*

Componente della miscela di eluizione	4 librerie	8 librerie	16 librerie	24 librerie	48 librerie
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1.824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

*Questa tabella include il volume in eccesso. Per i calcoli, consultare *Manipolazione dei reagenti* alla pagina 34.

7. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione preparata al momento, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte per il passaggio *Eluizione* alla pagina 75.
8. Se la piastra PL PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare a 280 × g per un minuto. Pipettare per miscelare.
9. Apporre un'etichetta "BBN" (Normalizzazione basata su microsfere) a una nuova piastra MIDI a 96 pozzetti.
10. Preparare il magnete.

Procedura

Legame

1. Miscelare tramite vortex la miscela master LNA1+LNB1.
2. Aggiungere immediatamente 45 µl di miscela master LNA1 + LNB1 a ciascun pozzetto della libreria sulla piastra BBN MIDI.
3. Eliminare la miscela master LNA1 + LNB1 rimanente.
4. Aggiungere 20 µl di ciascuna libreria dalla piastra PL PCR al pozzetto corrispondente della piastra BBN MIDI.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per 30 minuti.

7. Applicare il sigillo adesivo alla piastra PL PCR e riportarla nel luogo deputato alla conservazione.
8. Posizionare la piastra BBN MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
9. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.

Lavaggio

1. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
   a. Rimuovere la piastra BBN MIDI dal supporto magnetico.
   b. Aggiungere 45 µl di LNW1 a ciascun pozzetto della libreria.
   c. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
      Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
   d. Agitare a 1.800 giri/min per cinque minuti.
   e. Posizionare la piastra BBN MIDI su un supporto magnetico per 2 minuti.
   f. Tenere la piastra sul supporto magnetico. Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto del campione senza alterare il pellet di microsfere.
2. Lavare le microsfere una ***seconda*** volta.
3. Con una pipetta dalla punta sottile, rimuovere il surnatante residuo da ciascun pozzetto.

Eluizione

1. Rimuovere la piastra BBN MIDI dal supporto magnetico.
2. Miscelare tramite vortex la miscela di eluizione EE2 + HP3 preparata al momento, quindi centrifugare brevemente.
3. Aggiungere 32 µl di soluzione EE2 + HP3 a ciascun pozzetto della libreria della piastra BBN MIDI.
4. Eliminare la miscela di eluizione rimanente.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra BBN MIDI.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Agitare a 1.800 giri/min per due minuti.
7. Posizionare su un supporto magnetico per due minuti.
8. Apporre un'etichetta "NL" (Librerie normalizzate) a una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
9. Trasferire con attenzione 30 µl di eluato da ciascun pozzetto della libreria della piastra BBN MIDI al pozzetto corrispondente della piastra NL PCR.

   ⚠ ATTENZIONE

   Se le microsfere vengono aspirate nelle punte, erogarle nuovamente sulla piastra posta sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi chiaro (circa due minuti), prima di passare alla fase successiva della procedura.

10. Eliminare la piastra BBN MIDI vuota.

11. Miscelare l'LNS1 tramite vortex.
12. Aggiungere 30 µl di LNS1 a ciascun pozzetto della libreria nella nuova piastra NL PCR.
13. Pipettare cinque volte per mescolare.
14. Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
    Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
15. Riporre LNB1, LNA1, EE2, LNW1 e LNS1 nel luogo deputato alla conservazione.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Se fosse necessario fermarsi, centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per un minuto e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 32 giorni.

Preparazione del protocollo

Questa preparazione è necessaria per eseguire i passaggi del protocollo che precedono il sequenziamento.

Avviare la preparazione dei materiali di consumo per il sequenziamento del kit di reagenti NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 cicli) (n. codice 20028871) almeno un'ora prima dell'uso.

1. Rimuovere il tampone di diluizione della libreria (HT1) da -25 °C a -15 °C. Scongelare a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mantenere refrigerato.
2. Seguire le istruzioni di preparazione in *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per gli altri materiali di consumo nel kit.
   - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli)
   - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cicli)
   - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cicli)
3. Rimuovere le provette di reagente dalla confezione e seguire le istruzioni di scongelamento.

Tabella 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (n. codice 20031121)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
PhiX Internal Control (PX3 o PhiX)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Dopo lo scongelamento, mantenere refrigerato.	Preparazione per il sequenziamento

Tabella 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (n. codice 20031123)

Reagente	Conservazione	Istruzioni di scongelamento	Fase del protocollo
HP3	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Preparazione per il sequenziamento
RSB (etichetta rosa)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente.	Preparazione per il sequenziamento

Preparazione per il sequenziamento

Ogni corsa di sequenziamento del DNA e dell'RNA deve includere un controllo positivo e un NTC. Gli NTC per il DNA e l'RNA vengono singolarmente sequenziati ripetutamente a seconda delle necessità in modo che ogni corsa contenga un NTC. Ogni corsa di DNA e RNA include un controllo positivo distinto.

Preparazione

1. Rivedere le linee guida sul *Numero delle librerie e selezione degli indici* alla pagina 36.

2. Apporre un'etichetta "dHP3" (HP3 diluito) a una provetta per microcentrifuga.
3. Apporre un'etichetta "dPhiX" (PhiX diluito) a una provetta per microcentrifuga.
4. Preriscaldare un blocco termico a 96 °C per provette da microcentrifuga.
5. Preparare un portaghiaccio o prodotto equivalente.

Diluizione e denaturazione del campione di controllo PhiX

1. Miscelare l'HP3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
2. Combinare i volumi seguenti nella provetta per microcentrifuga del dHP3:
   - 10 µl HP3
   - 190 µl di acqua priva di DNasi/RNasi
3. Miscelare il dHP3 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
4. Invertire o miscelare tramite vortex l'RSB.
5. Miscelare il campione di controllo PhiX tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
6. Combinare i volumi seguenti nella provetta per microcentrifuga del dPhiX:
   - 8 µl di RSB
   - 2 µl di campione di controllo PhiX
7. Aggiungere 10 µl di dHP3 alla provetta del dPhiX.
8. Eliminare la provetta del dHP3.
9. Miscelare la provetta dPhiX tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
10. Incubare il dPhiX a temperatura ambiente per cinque minuti per denaturare.
11. Miscelare l'HT1 tramite vortex.
12. Aggiungere immediatamente 980 µl di HT1 preraffreddato al dPhiX.
13. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
14. Conservare il PhiX al freddo fino all'utilizzo nella preparazione della seconda diluizione.
    La concentrazione finale è 20 pM dPhiX.
15. Riportare PhiX, HP3 e RSB nel luogo deputato alla conservazione.

Raggruppamento e denaturazione delle librerie per TSO Comprehensive (UE)

1. Se la piastra NL PCR è stata conservata, scongelarla a temperatura ambiente, quindi centrifugare la piastra a 280 × g per un minuto.
2. Usando una pipetta multicanale impostata su 30 µl, mescolare delicatamente le librerie nella piastra NL PCR per cinque volte.
   Usare punte nuove per ogni libreria.

   ⚠ ATTENZIONE

   Per ottenere prestazioni ottimali, assicurarsi di mescolare bene le librerie.

3. Per raggruppare, denaturare e diluire le librerie, selezionare una delle seguenti opzioni:
   - **[Opzione 1]** Sequenziamento di librerie derivate da campioni di RNA e da campioni di DNA simultaneamente. Consultare *Opzione n. 1: Librerie di DNA e RNA insieme* alla pagina 79.
   - **[Opzione 2]** Sequenziamento di librerie derivate solo da campioni di DNA. Consultare *Opzione n. 2: Solo librerie di DNA* alla pagina 80.
   - **[Opzione 3]** Sequenziamento di librerie derivate solo da campioni di RNA. Consultare *Opzione n. 3: Solo librerie di RNA* alla pagina 81.

Opzione n. 1: Librerie di DNA e RNA insieme

1. Apporre un'etichetta "PRL" (Librerie di RNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
2. Apporre un'etichetta "PDL" (Librerie di DNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
3. Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di RNA (cDNA) normalizzata dalla piastra NL alla provetta PRL.
   Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.
4. Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di DNA normalizzata dalla piastra NL alla provetta PDL.
   Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.
5. Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
6. Miscelare tramite vortex le provette PRL e PDL.
7. Centrifugare brevemente le provette PRL e PDL.
8. Incubare le provette PRL e PDL in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
9. Conservare le provette PRL e PDL al freddo per 5 minuti.
10. Miscelare tramite vortex le provette PRL e PDL, quindi centrifugare brevemente.
11. Conservare le provette PRL e PDL al freddo.

Preparazione della prima diluizione

1. Apporre un'etichetta "DIL1" (Diluizione 1) a una provetta per microcentrifuga.
2. Trasferire 20 µl del PDL nella provetta DIL1 vuota.
3. Aggiungere 5 µl di PRL alla provetta DIL1.
4. Eliminare le provette di PDL e PRL.
5. Aggiungere 475 µl dell'HT1 preraffreddato alla provetta DIL1 (diluizione 1:20).
6. Miscelare tramite vortex la provetta del DIL1, quindi centrifugare brevemente.

Preparazione della seconda diluizione

1. Apporre un'etichetta "DIL2" (Diluizione 2) a una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml.
2. Trasferire 40 µl di DIL1 nella provetta del DIL2 vuota.

3. Eliminare la provetta del DIL1.
4. Aggiungere 1.660 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL2 (diluizione 1:850).
5. Miscelare tramite vortex un preparato di dPhiX 20 pM, quindi centrifugare brevemente.
6. Aggiungere 2,5 µl di preparato dPhiX 20 pM alla provetta del DIL2.
7. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
8. Caricare 1.300 µl di DIL2 nella NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli) scongelata. Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.
9. Eliminare la provetta del DIL2.
10. Centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per un minuto, quindi conservarla a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 32 giorni.
11. Passare al sequenziamento.
    Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.

Opzione n. 2: Solo librerie di DNA

1. Apporre un'etichetta "PDL" (Librerie di DNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
2. Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di DNA normalizzata dalla piastra NL alla provetta PDL.
   Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.
3. Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti.
4. Miscelare la provetta PDL tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
5. Incubare la provetta PDL in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
6. Conservare la provetta PDL al freddo per 5 minuti.
7. Miscelare la provetta PDL tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
8. Conservare la provetta PDL al freddo.

Preparazione della prima diluizione

1. Apporre un'etichetta "DIL1" (Diluizione 1) a una provetta per microcentrifuga.
2. Trasferire 10 µl di PDL nella provetta del DIL1 vuota.
3. Eliminare la provetta PDL.
4. Aggiungere 190 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL1 (diluizione 1:20).
5. Miscelare DIL1 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

Preparazione della seconda diluizione

1. Apporre un'etichetta "DIL2" (Diluizione 2) a una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml.

2. Trasferire 40 µl di DIL1 nella provetta del DIL2 vuota.
3. Eliminare la provetta del DIL1.
4. Aggiungere 1.660 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL2 (diluizione 1:850).
5. Miscelare tramite vortex un preparato dPhiX 20 pM, quindi centrifugare brevemente.
6. Aggiungere 2,5 µl di preparato dPhiX 20 pM alla provetta del DIL2.
7. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
8. Caricare 1.300 µl di DIL2 nella NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli) scongelata. Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.
9. Eliminare la provetta del DIL2.
10. Centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per un minuto, quindi conservarla a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 32 giorni.
11. Passare al sequenziamento.
    Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.

Opzione n. 3: Solo librerie di RNA

1. Apporre un'etichetta "PRL" (Librerie di RNA raggruppate) a una provetta da microcentrifuga.
2. Trasferire 10 µl di ciascuna libreria di RNA (cDNA) normalizzata dalla piastra NL alla provetta PRL.
   Non raggruppare due librerie con lo stesso index primer.
3. Applicare il sigillo adesivo alla piastra NL PCR.
   Sigillare completamente i bordi e i pozzetti per evitare l'evaporazione.
4. Miscelare tramite vortex la provetta PRL.
5. Centrifugare brevemente la provetta PRL.
6. Incubare la provetta PRL in un blocco termico a 96 °C per due minuti.
7. Conservare la provetta PRL al freddo per 5 minuti.
8. Miscelare la provetta PRL tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
9. Conservare la provetta PRL al freddo.

Preparazione della prima diluizione

1. Apporre un'etichetta "DIL1" (Diluizione 1) a una provetta per microcentrifuga.
2. Trasferire 10 µl di PRL nella provetta del DIL1 vuota.
3. Eliminare la provetta PRL.
4. Aggiungere 190 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL1 (diluizione 1:20).
5. Miscelare DIL1 tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.

Preparazione della seconda diluizione

1. Apporre un'etichetta "DIL2" (Diluizione 2) a una provetta per microcentrifuga da 2,0 ml.
2. Trasferire 40 µl di DIL1 nella provetta del DIL2 vuota.
3. Eliminare la provetta del DIL1.
4. Aggiungere 1.646 µl di HT1 preraffreddato alla provetta del DIL2 (diluizione 1:843).
5. Miscelare tramite vortex un preparato dPhiX 20 pM, quindi centrifugare brevemente.
6. Aggiungere 16,7 µl di preparato dPhiX 20 pM alla provetta del DIL2.
7. Miscelare tramite vortex, quindi centrifugare brevemente.
8. Caricare 1.300 µl di DIL2 nella NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicli) scongelata. Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.
9. Eliminare la provetta del DIL2.
10. Centrifugare la piastra NL PCR a 280 × g per un minuto e conservare a temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 32 giorni.
11. Passare al sequenziamento.
    Consultare *Guida di consultazione dello strumento NextSeq 550Dx (documento n. 1000000009513)* per ulteriori informazioni.

Interpretazione dei risultati

Per ogni singolo campione i risultati di sequenziamento del saggio TSO Comprehensive (UE) vengono riportati in un report in formato PDF e in un report in formato JSON. A livello di campione viene generato anche un Low Depth Report (Report della profondità bassa) (`LowDepthReport.tsv`).

A livello della corsa vengono generati i seguenti file di output:

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

Solo le varianti che superano il controllo qualità vengono riportate nei report in formato PDF e JSON.

Per informazioni dettagliate sull'analisi, consultare *Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661)*.

Risultati della diagnostica di accompagnamento

Per ogni uso previsto della diagnostica di accompagnamento (CDx), è possibile ottenere uno dei tre possibili risultati:

- **Positivo**: viene rilevata/o una variante o un biomarcatore e classificata/o come Level 1 (Livello 1) (CDx).

- **Non rilevato**: nessuna variante o biomarcatore associato all'uso previsto dal CDx viene rilevato nel campione. Il tipo di tumore selezionato per il campione è appropriato per il CDx.
- **Nessun risultato**: la determinazione dello stato di una variante non è possibile per uno o più dei seguenti motivi:
  - L'uso previsto del CDx non era pertinente per il campione analizzato perché il tipo di tumore selezionato per il campione non è appropriato per il tipo di tumore del CDx.
  - La corsa di sequenziamento non ha superato le specifiche del controllo di qualità.
  - La libreria non ha superato le specifiche richieste del controllo qualità.
  - L'acido nucleico appropriato non è stato eseguito.

Tutti i risultati degli usi previsti di CDx sono riportati nella sezione Companion Diagnostic Results (Risultati diagnostica di accompagnamento) del report JSON. Solo gli usi previsti con un risultato positivo sono elencati nella sezione Companion Diagnostic Results (Risultati diagnostica di accompagnamento) del report PDF.

Varianti del profilo del tumore

TSO Comprehensive (UE) è progettato per riportare le varianti somatiche durante il rilevamento delle varianti con evidenza di significato clinico o varianti con potenziale significato clinico. Il software del saggio TSO Comprehensive (UE) utilizza una KB che determina se ogni variante rilevata e idonea (Tabella 2) ha significato clinico o significato potenzialmente clinico in base a evidenza di associazioni terapeutiche, diagnostiche o prognostiche. La KB considera anche se le associazioni sono stabilite (o no) nel tipo di tumore testato. Le associazioni di suscettibilità o di rischio di tumore non sono incluse nella KB. I polimorfismi comuni sono rimossi.

Per le varianti del profilo del tumore, i risultati positivi vengono classificati in Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance, Livello 2 (Risultati genomici con evidenza di significato clinico, Livello 2) oppure in Genomic Findings with Potential Clinical Significance, Livello 3 (Risultati genomici con potenziale significato clinico, Livello 3) in base alla KB e al tipo di tumore identificato.

I controlli qualità non riusciti non forniscono risultati per i tipi di variante rilevanti per la metrica di controllo qualità fallita. Per ulteriori informazioni, consultare la Tabella 40 e la Tabella 41. Le posizioni del profilo tumorale con profondità insufficiente sono elencate in Low Depth Report (Report della profondità bassa) e non nel report di TSO Comprehensive (UE).

Controllo qualità

- Per informazioni sulla quantificazione dell'acido nucleico e sui requisiti minimi del materiale di input, consultare *Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico* alla pagina 28.
- La corsa di sequenziamento e la validità del campione sono determinate automaticamente e riportate dal Modulo di analisi TSO Comprehensive (UE). Per informazioni dettagliate sull'analisi, consultare *Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661)*.

- Il report di TSO Comprehensive (UE), disponibile nei formati PDF e JSON, riepiloga i risultati del controllo qualità. I report si trovano nella cartella dell'analisi. Consultare *Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661)* per la posizione della cartella di analisi (contiene i report PDF e JSON) e della cartella di esecuzione.

Tabella 40 Metriche di controllo qualità dei risultati del report TSO Comprehensive (UE)

Tipo di output	Metrica	Specifica	Descrizione	Impatto del mancato rispetto delle specifiche*
Corsa di sequenziamento	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	La percentuale di letture che attraversano il filtro (PF).	Esecuzione di sequenziamento invalidata. Non sono stati riportati risultati per nessun campione della corsa.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	La percentuale media delle identificazioni delle basi con punteggio qualitativo di Q30 o superiore per Read 1 (Lettura 1).	Esecuzione di sequenziamento invalidata. Non sono stati riportati risultati per nessun campione della corsa.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	La percentuale media delle identificazioni delle basi con punteggio qualitativo di Q30 o superiore per Read 2 (Lettura 2).	

Tipo di output	Metrica	Specifica	Descrizione	Impatto del mancato rispetto delle specifiche*
Librerie di DNA	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3.106 OPPURE > 3.106 e P_VALUE ≤ 0,049	Una metrica che valuta la probabilità di contaminazione utilizzando il valore VAF delle varianti comuni. Il punteggio della contaminazione basato sulla distribuzione del valore VAF di SNP. Il valore p di contaminazione viene utilizzato per valutare genomi altamente riorganizzati. È applicabile solo quando il punteggio di contaminazione è superiore al limite superiore delle specifiche.	Nessun risultato di DNA riportato.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	La lunghezza mediana dei frammenti nel campione.	Nessun risultato di TMB o varianti piccole di DNA riportato.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (conteggio)	≥ 150	La copertura mediana del frammento dell'esone su tutte le basi degli esoni.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	La percentuale di basi esoniche con copertura dei frammenti di 50X.	

Tipo di output	Metrica	Specifica	Descrizione	Impatto del mancato rispetto delle specifiche*
	USABLE_MSI_ SITES (conteggio)	≥ 40	Il numero di siti MSI utilizzabili per l'identificazione di MSI (numero di siti microsatellitari con letture sufficientemente coperte per identificare l'instabilità microsatellitare).	Nessun risultato MSI riportato.
	COVERAGE_MAD (conteggio)	≤ 0,210	La mediana delle deviazioni assolute dalla mediana del conteggio normalizzato di ogni regione CNV target.	Nessun risultato di amplificazione genica riportato.
	MEDIAN_BIN_ COUNT_CNV_ TARGET (conteggio)	≥ 1,0	Il conteggio raggruppato mediano non elaborato per la CNV target.	
Librerie di RNA	MEDIAN_INSERT_ SIZE (bp)	≥ 80	La lunghezza mediana dei frammenti nel campione.	Nessun risultato di fusioni o varianti di splicing riportato.

Tipo di output	Metrica	Specifica	Descrizione	Impatto del mancato rispetto delle specifiche*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (coefficiente)	≤ 0,93	MEDIAN_CV_GENE_500X è una misura dell'uniformità di copertura. Per ogni gene con una copertura di almeno 500x, viene calcolato il coefficiente di variazione nella copertura sul corpo del gene. Questa metrica è una mediana di questi valori. Un valore elevato indica un livello elevato di variazione, quindi un problema nella preparazione delle librerie come una quantità insufficiente di input del campione/problemi con il pulldown delle sonde. Questa metrica viene calcolata utilizzando tutte le letture (incluse le letture marcate come duplicati).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (conteggio)	≥ 9.000.000	Il numero totale di letture mappate sulle regioni target. Questa metrica viene calcolata utilizzando tutte le letture (incluse le letture marcate come duplicati).	

* Per i risultati corretti viene mostrato il valore PASS (SUPERATO).

Tabella 41 TSO Comprehensive (UE) Metriche di controllo dei risultati del report

Tipo di output	Metrica	Specifica	Impatto del mancato rispetto delle specifiche*
Controllo positivo	DNA esterno di controllo	Rilevate 23 delle 24 varianti specificate	Necessità di invalidare manualmente i campioni dei pazienti in base ai risultati dei campioni di controllo. Il software del modulo di analisi non invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei campioni di controllo.
	RNA esterno di controllo	Rilevate 12 delle 13 varianti specificate	
Nessun controllo templato	DNA copertura mediana degli esoni per TSO Comprehensive (UE)	≤ 8	Necessità di invalidare manualmente i campioni dei pazienti in base ai risultati dei campioni di controllo. Il software del modulo di analisi non invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei campioni di controllo.
	RNA - Geni al di sopra del cutoff mediano	≤ 1	

* Per i risultati corretti viene mostrato il valore PASS (SUPERATO).

- Ripetere le corse di sequenziamento non valide.
- Ripetere i test delle librerie con i seguenti risultati:
  - librerie di DNA contaminate;
  - librerie di RNA non valide;
  - per ottenere più risultati di varianti o biomarcatori per le librerie di DNA invalidate per uno ma non per tutti i tipi di varianti, è possibile ripetere i test.
- I controlli positivi vengono valutati per l'identificazione delle varianti. Se i controlli positivi non soddisfacessero le specifiche di identificazione delle varianti, invalidare manualmente la corsa di sequenziamento. Il software del modulo di analisi non invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei campioni di controllo.
- Gli NTC vengono valutati rispetto alla copertura mediana degli esoni per il DNA e ai geni al di sopra del cutoff mediano per l'RNA. Se i controlli negativi non soddisfacessero le specifiche, invalidare manualmente l'evento di preparazione delle librerie e tutte le corse di sequenziamento associate. Il software del modulo di analisi non invalida automaticamente i campioni dei pazienti sulla base dei risultati dei campioni di controllo.
- Eseguire ulteriori misure di controllo qualità in conformità alle normative locali, statali e/o federali o ai requisiti di accreditamento.

Per maggiori informazioni sulla ripetizione di corse di sequenziamento o sull'analisi di librerie, consultare *Risoluzione dei problemi* alla pagina 89.

Risoluzione dei problemi

Per risolvere i problemi nel flusso di lavoro, utilizzare la seguente tabella. Se una corsa di sequenziamento o la preparazione delle librerie per un campione non riuscisse per due volte, è necessaria un'ulteriore operazione di risoluzione dei problemi. Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
La corsa di sequenziamento non supera le specifiche del controllo qualità	• Errore di raggruppamento • Errore diluizione • Denaturazione termica incompleta di PRL/PDL • Problemi con la preparazione dei materiali di consumo di sequenziamento (ad esempio, non adeguatamente scongelati, condensa/detriti sulla cella a flusso)	• Risequenziare le librerie dalla piastra NL PCR (Librerie normalizzate). Consultare *Preparazione per il sequenziamento* alla pagina 77.
	• Uso non corretto delle sonde di arricchimento (ad esempio, sonde OPR1 utilizzate per i campioni di DNA, sonde OPD2 utilizzate per i campioni di RNA) • Errore nel flusso di lavoro di preparazione della libreria durante o dopo la prima fase di ibridazione.	Ripetere i passaggi di arricchimento per le librerie dalla piastra ALS PCR (Campioni delle librerie amplificate). Consultare *Configurazione della prima ibridazione* alla pagina 60.
	I requisiti per l'input del campione non sono stati soddisfatti	Avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Consultare *Denaturazione e appaiamento dell'RNA* alla pagina 45 o *Frammentazione del gDNA* alla pagina 50.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
	Errore nel flusso di lavoro di preparazione della libreria durante o prima della fase di indicizzazione PCR	Ripetere i passaggi di arricchimento per le librerie dalla piastra ALS PCR (Campioni delle librerie amplificate). Consultare *Configurazione della prima ibridazione* alla pagina 60.
	Problema dello strumento	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
Errore nella generazione del report o errore generale dello strumento (errore di rete, errori di caricamento/scaricamento dei reagenti ecc.).	Problema del software o dello strumento.	Consultare Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661) per assistenza nella generazione di report. Per ricevere ulteriore assistenza, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
La libreria di DNA non supera le specifiche del controllo qualità.	I requisiti per l'input del campione non sono stati soddisfatti.	Assicurarsi che l'input del campione sia appropriato e ripetere la preparazione delle librerie dal passaggio "Frammentazione del gDNA". Consultare *Requisiti dei campioni* alla pagina 27 ed *Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico* alla pagina 28.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
	Errore di utilizzo o di apparecchiatura nel flusso di lavoro del saggio	Ripetere la preparazione delle librerie da uno dei seguenti passaggi a seconda del punto in cui si è verificato il sospetto errore di utilizzo o di apparecchiatura. Se si ignorasse il punto o se si verificano errori di altro tipo, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina per risolvere i problemi della corsa. • Risequenziare le librerie dalla piastra NL PCR (Librerie normalizzate). Consultare *Preparazione per il sequenziamento* alla pagina 77. • Ripetere i passaggi di arricchimento per le librerie dalla piastra ALS PCR (Campioni delle librerie amplificate). Consultare *Configurazione della prima ibridazione* alla pagina 60. • Avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Consultare *Frammentazione del gDNA* alla pagina 50.
	I criteri CONTAMINATION_SCORE e CONTAMINATION_P_VALUE non sono stati soddisfatti.	Consultare nuovamente le avvertenze e le precauzioni per informazioni su come evitare la contaminazione incrociata. Rivedere il layout della piastra e l'indicizzazione della libreria per assicurarsi che le librerie dello stesso indice non siano state sequenziate insieme. Per le librerie interessate, avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Consultare *Frammentazione del gDNA* alla pagina 50. La contaminazione potrebbe essersi verificata durante l'estrazione del campione. Potrebbe essere necessario ripetere l'estrazione per assicurarsi che il campione sia privo di contaminazione.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
	MSI utilizzabili non riuscito.	Rivedere le impostazioni del produttore del sonificatore a ultrasuoni relative all'uso e al funzionamento (compreso il livello dell'acqua e il tipo di provetta). Assicurarsi che l'input di campione nel saggio sia appropriato. Consultare *Requisiti dei campioni* alla pagina 27 ed *Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico* alla pagina 28. Se il campione fosse eccessivamente frammentato o danneggiato, potrebbe essere necessaria una nuova estrazione del campione e/o la ripetizione del passaggio "Frammentazione del gDNA".
	Il campione è eccessivamente frammentato o presenta danni all'acido nucleico che incidono sulla capacità di generare sufficienti librerie univoche.	Rivedere *Impostazioni di configurazione del sonificatore a ultrasuoni per la frammentazione del DNA* alla pagina 24 e le impostazioni del produttore del sonificatore a ultrasuoni per l'uso e il funzionamento (incluso il livello dell'acqua e il tipo di provetta). Assicurarsi che l'input di campione nel saggio sia appropriato. Consultare *Requisiti dei campioni* alla pagina 27 ed *Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico* alla pagina 28. Se il campione fosse eccessivamente frammentato o danneggiato, potrebbe essere necessaria una nuova estrazione del campione e/o la ripetizione del passaggio "Frammentazione del gDNA".

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
La libreria dell'RNA non supera le specifiche del controllo qualità.	I requisiti per l'input del campione non sono stati soddisfatti.	Assicurarsi che l'input del campione sia appropriato e ripetere la preparazione delle librerie dal passaggio "Denaturazione e appaiamento dell'RNA". Consultare *Requisiti dei campioni* alla pagina 27 ed *Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico* alla pagina 28.
	Errore di utilizzo o di apparecchiatura nel flusso di lavoro del saggio	Ripetere la preparazione delle librerie da uno dei seguenti passaggi a seconda del punto in cui si è verificato il sospetto errore di utilizzo o di apparecchiatura. Se si ignorasse il punto o se si verificano errori di altro tipo, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina per risolvere i problemi della corsa. • Risequenziare le librerie dalla piastra NL PCR (Librerie normalizzate). Consultare *Preparazione per il sequenziamento* alla pagina 77. • Ripetere i passaggi di arricchimento per le librerie dalla piastra ALS PCR (Campioni delle librerie amplificate). Consultare *Configurazione della prima ibridazione* alla pagina 60. • Avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Consultare *Denaturazione e appaiamento dell'RNA* alla pagina 45.
	Il campione è eccessivamente frammentato o presenta danni all'acido nucleico che incidono sulla capacità di generare sufficienti librerie univoche.	Assicurarsi che l'input del campione sia appropriato. Consultare *Requisiti dei campioni* alla pagina 27 ed *Estrazione, quantificazione e conservazione dell'acido nucleico* alla pagina 28. Se il campione fosse eccessivamente frammentato o danneggiato, potrebbe essere necessaria una nuova estrazione del campione.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
Mancata esecuzione del controllo positivo (DNA/RNA).	I requisiti di input del campione per il controllo positivo non sono stati soddisfatti	Assicurarsi che l'input del saggio sia appropriato. Rivedere il layout della piastra e assicurarsi che i reagenti appropriati (sonde, indici) si trovino nei pozzetti corretti. Assicurarsi che il campione di controllo positivo sia conservato secondo l'etichetta. Per tutti i campioni che condividono il controllo positivo, ripetere la preparazione delle librerie da uno dei passaggi seguenti, a seconda del punto in cui si è verificato il sospetto errore di utilizzo o di apparecchiatura. Se si ignorasse il punto o se si verificano errori di altro tipo, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina per risolvere i problemi della corsa.
	Errore di utilizzo o di apparecchiatura nel flusso di lavoro del saggio	• Risequenziare le librerie dalla piastra NL PCR (Librerie normalizzate). Consultare *Preparazione per il sequenziamento* alla pagina 77. • Ripetere i passaggi di arricchimento per le librerie dalla piastra ALS PCR (Campioni delle librerie amplificate). Consultare *Configurazione della prima ibridazione* alla pagina 60. • Avviare la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro. Consultare *Denaturazione e appaiamento dell'RNA* alla pagina 45 o *Frammentazione del gDNA* alla pagina 50.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
NTC non riuscito (DNA/RNA).	Si è verificata una contaminazione incrociata o una contaminazione dell'area di lavoro.	Consultare la sezione Avvertenze e precauzioni per informazioni sulla decontaminazione delle aree di lavoro e per evitare la contaminazione incrociata. Rivedere il layout della piastra e l'indicizzazione della libreria per assicurarsi che le librerie dello stesso indice non siano state sequenziate insieme. Ripetere la preparazione delle librerie dall'inizio del flusso di lavoro per tutte le librerie che condividono il controllo senza templato.
	Indicizzazione errata della libreria.	
Il software indica che i controlli positivi e/o negativi non sono stati inclusi nella corsa di sequenziamento.	Assegnazione errata del tipo di tumore nella pianificazione della corsa Local Run Manager.	Ripetere l'analisi con i controlli correttamente identificati come indicato nella Guida al flusso di lavoro del modulo di analisi (consultare *Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661)*).

Caratteristiche delle prestazioni

TSO Comprehensive (UE) è un pannello NGS mirato che rileva alterazioni in 517 geni. Varianti piccole di DNA (varianti di singolo nucleotide [SNV], varianti di multipli nucleotidi [MNV], inserzioni e delezioni) possono essere riportate da tutti i 517 geni. Il carico mutazionale del tumore è riportato come un punteggio basato su un conteggio di varianti somatiche non driver per megabase (consultare *Guida al flusso di lavoro di Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) Analysis Module (documento n. 200008661)* per i dettagli). MSI è riportato come stato. Le amplificazioni geniche dai geni MET e ERBB2 sono idonee per il report. Le fusioni possono essere riportate dai 23 geni indicati in *Riepilogo e descrizione del saggio* alla pagina 1. Le varianti di splicing dai geni MET e EGFR sono idonee per il report. Per essere riportate, le varianti devono essere rilevate e avere evidenze nella KB del saggio TSO Comprehensive (UE) e devono essere idonee in base al tipo di tessuto analizzato. Per essere riportate, le fusioni di NTRK richiedono il partner di fusione 5' e la chinasi di NTRK deve essere intatta.

Per le varianti piccole di DNA, è stato condotto un approccio rappresentativo per validare i geni target nel pannello con dati che rappresentavano SNV, MNV, inserzioni e delezioni. Per le amplificazioni geniche, le fusioni e le varianti di splicing l'analisi è stata condotta a livello di gene. TMB e MSI sono state valutate dove indicato. Per la dichiarazione delle fusioni CDx per NTRK, le fusioni dei campioni in FFPE sono state analizzate in studi mirati sulle prestazioni specifiche per la dichiarazione (come limite di rilevamento, precisione all'interno del laboratorio, riproducibilità, accuratezza e prestazioni cliniche).

La Tabella 42 fornisce le definizioni delle metriche calcolate in diversi studi.

Tabella 42 Definizioni delle metriche

Termine	Definizione
Percentuale di concordanza positiva (PPA)	La percentuale di positivi correttamente identificati sul totale dei positivi in relazione a un metodo ortogonale.
Percentuale di concordanza negativa (NPA)	La percentuale di negativi correttamente identificati sul totale dei negativi in relazione a un metodo ortogonale.
Percentuale di concordanza complessiva (OPA)	La percentuale di positivi e negativi correttamente identificati sul totale delle osservazioni in relazione a un metodo ortogonale.
Percentuale identificazioni positive (Percent Positive Call, PPC)	La percentuale di osservazioni positive per un target tra le osservazioni previste come positive per il target.
Percentuale identificazioni negative (Percent Negative Call, PNC)	La percentuale di osservazioni negative per un target tra le osservazioni previste come negative per il target.
n/N	Il numero di osservazioni positive o negative (n) diviso per le osservazioni totali (N) per calcolare rispettivamente PPC o PNC. I valori di n e N possono essere a livelli diversi (ad es. variante o gene) o combinati in un gruppo (ad es. SNV).
Deviazione standard (DS)	Una misura della quantità di variazione dei valori di una variabile circa la sua media.
Percentuale coefficiente di variazione (%CV)	Deviazione standard divisa per la media in percentuale.

Contaminazione incrociata

Lo studio sulla contaminazione incrociata è stato condotto per valutare se nel saggio si riscontrano dei risultati falsi positivi, dovuti alla contaminazione da pozzetto a pozzetto durante la preparazione delle librerie e alla contaminazione da corsa a corsa tra corse di sequenziamento consecutive. Quest'analisi è stata eseguita per piccole varianti del DNA (che hanno impatti anche su TMB), fusioni, amplificazioni geniche e MSI. Le librerie sono state preparate da campioni caratterizzati in una disposizione a scacchiera con campioni alternati per valutare la contaminazione da pozzetto a pozzetto e con indici alternati per valutare la contaminazione da corsa

a corsa tra corse di sequenziamento consecutive sullo stesso strumento NextSeq 550Dx. Lo studio sulla contaminazione incrociata ha mostrato zero eventi di contaminazione; l'osservazione è stata effettuata esaminando le varianti rilevate in ogni campione e non ha rilevato falsi positivi.

Per il saggio TSO Comprehensive (UE) sono state concepite due metriche QC (CONTAMINATION_SCORE e P_VALUE) al fine di rilevare la contaminazione del campione nei campioni di DNA. È stata valutata la sensibilità al rilevamento della contaminazione. I campioni di DNA tumorale FFPE sono stati miscelati con quantità variabili di campioni di DNA normale FFPE per creare campioni appositamente contaminati.

In totale, sono state generate 1.112 osservazioni di contaminazione e la contaminazione è stata rilevata nel 95% (1.054) delle osservazioni. Il tasso di rilevamento è salito al 96% (939/976) quando la percentuale di contaminazione era compresa tra il 10% e il 90% (massa/massa). Delle 37 osservazioni tra il 10% e il 90% di contaminazione in cui la contaminazione non è stata rilevata, 12 non soddisfacevano le specifiche di copertura per definire piccole varianti del DNA. La bassa copertura ostacola il rilevamento della contaminazione, ma non sono riportate piccole varianti di DNA che mitigano gli effetti della contaminazione. Quindici osservazioni non hanno soddisfatto la specifica di amplificazione genica (metrica QC del conteggio medio dell'intervallo) per definire l'amplificazione genica. Per i campioni non viene riportato alcun risultato di amplificazione genica.

Lo studio ha dimostrato che il saggio TSO Comprehensive (UE) dovrebbe avere un basso tasso di contaminazione incrociata da un pozzetto all'altro o da una corsa all'altra. Questi risultati, insieme alle metriche di contaminazione nel software, mitigano il rischio di risultati di false varianti a causa della contaminazione del campione.

Valutazione di Nucleic Acid Extraction Kit

Con TSO Comprehensive (UE) sono stati valutati tre kit di estrazione del DNA e dell'RNA disponibili in commercio. I tre kit di estrazione hanno isolato sia il DNA che l'RNA dalle stesse sezioni di tessuto in FFPE. I kit si differenziavano per l'agente di deparaffinizzazione e per le fasi di legame dell'acido nucleico (Tabella 43). Il kit n. 1 è stato il kit di estrazione principale per la determinazione delle prestazioni di TSO Comprehensive (UE).

Tabella 43 Caratteristiche dei kit

Kit	Agente di deparaffinizzazione	Legame dell'acido nucleico
1	Proprietario	Colonna
2	Xilene	Colonna
3	Olio minerale	Microsfere magnetiche

La Tabella 44 e la Tabella 45 riepilogano gli effetti dei kit di estrazione sulla validità delle librerie e sull'identificazione delle varianti. Se il contenuto dei kit di estrazione era diverso in modo significativo, la differenza era riportata. Le differenze medie tra i kit di estrazione sono state calcolate con il Kit 1 come controllo dal momento che il Kit 1 è stato utilizzato per estrarre la maggior parte degli acidi nucleici utilizzati per gli studi analitici TSO Comprehensive (UE). La differenza media rispetto al Kit 1 è stata riportata per illustrare come diversi kit di estrazione influenzerebbero gli altri studi analitici TSO Comprehensive (UE).

Tabella 44 Effetti dei kit di estrazione sulla validità delle librerie

Tipo di variante	Metriche di controllo qualità delle librerie	Differenza media rispetto al kit 1
Varianti piccole di DNA/TMB	Copertura mediana degli esoni (conteggio) PCT Exon 50X (%) Dimensione mediana dell'inserto (bp)	Kit 2 inferiore di 56 letture Kit 3 superiore dello 0,298% Kit 2 e Kit 3 inferiori di 3 bp
DNA MSI	Siti MSI utilizzabili	Kit 3 superiore di 8 centri
Amplificazione genica del DNA	Copertura MAD (conteggio)	Kit 2 inferiore di 0,0043
	Conteggio contenitore mediano	Kit 2 inferiore di 0,5825, Kit 3 superiore di 0,3086
RNA (Fusioni/varianti di splicing)	Dimensione mediana dell'inserto (bp) Registro (Mediana CV Gene500X) Totale su letture target	Kit 3 superiore di 2 bp Kit 2 superiore dello 0,029 Nessuna differenza significativa

È stato osservato che il kit di estrazione 2 e il kit 3 presentano un maggior numero di letture di supporto, per cui le fusioni e le varianti di splicing in prossimità della LoD hanno una maggiore probabilità di essere rilevate a causa della selezione del kit di estrazione.

Tabella 45 Effetti dei kit di estrazione sull'identificazione delle varianti

Tipo di variante (unità)	Identificazione variante (differenza media rispetto al kit 1)
Varianti piccole di DNA (VAF)	Non tecnicamente significativo Varianti target: la varianza tra kit era piccola rispetto al residuo Varianti non target: nessuna differenza significativa per i primi due intervalli VAF. Non sono state osservate differenze significative in termini di significatività statistica.
TMB (mutazione per megabase)	Non tecnicamente significativo, la varianza tra i kit era minima rispetto ai residui
MSI (% di siti instabili)	Kit 3 inferiore dell'1,9% per siti instabili
Amplificazione genica (variazione)	Kit 2 (0,06) e Kit 3 (0,08) maggiore variazione
Fusioni (letture di supporto)	Il Kit 2 ha registrato un aumento del 51% e il Kit 3 del 23% delle letture di supporto.
Varianti di splicing (letture di supporto)	I kit 2 e 3 hanno registrato un aumento del 48% delle letture di supporto.

Sostanze interferenti

È stato valutato l'impatto di potenziali sostanze endogene ed esogene sulle prestazioni del saggio TSO Comprehensive (UE). Le sostanze endogene (melanina ed emoglobina) sono state aggiunte nei campioni durante il processo di estrazione dell'acido nucleico. Le sostanze esogene (etanolo, xilene e proteinasi K) erano presenti durante il processo di estrazione dell'acido nucleico e sono inoltre state aggiunte nell'acido nucleico purificato prima della preparazione delle librerie. Laddove è stata osservata interferenza con la proteinasi K aggunta, sono state valutate anche concentrazioni aumentate di proteinasi K durante il processo di estrazione. Durante la preparazione della libreria sono stati aggiunti primer indice in eccesso (15% e 30%). Tranne che per i primer indice, le sostanze sono state aggiunte a campioni FFPE di cervello, mammella, colon, polmone, tiroide midollare, NSCLC, ovaie, prostata, tessuto salivare, pelle, tessuto molle e tessuto tiroideo: otto campioni sono stati estratti per l'analisi del DNA e 13 sono stati estratti per l'analisi dell'RNA. Per i primer indice, sono stati utilizzati sei campioni FFPE di tre diversi tipi di tessuto (tiroide, vescica, colon) per l'analisi del DNA e cinque campioni FFPE di quattro diversi tipi di tessuto (polmone, tiroide, colon, mammella) per l'analisi dell'RNA. È stato osservato un controllo endogeno senza aggiunta e un controllo esogeno con aggiunta di tampone o acqua per ciascuno dei 16 campioni unici. L'effetto della necrosi è stato valutato su un diverso gruppo di otto campioni in FFPE da tessuto di polmone, cerebrale e colon. Per ogni campione di tessuto necrotico era presente un controllo privo di necrosi sottoposto a macrodissezione. Per tutte le sostanze interferenti, sono stati analizzati quattro replicati per campione e per sostanza con il saggio TSO Comprehensive (UE) e sono stati confrontati con il rispettivo controllo per il rilevamento di varianti piccole di DNA, amplificazioni geniche, fusioni di RNA e varianti di splicing di RNA nonché lo stato MSI e il punteggio TMB. Sono state incluse sia le varianti CDx sia le varianti di profilazione tumorale.

Rilevamento delle varianti di DNA

La melanina (0,2 µg/ml), l'emoglobina (2 mg/ml), l'etanolo (5%), la proteinasi K (0,04 mg/ml in acido nucleico) e lo xilene (0,0001%) non interferiscono con il punteggio TMB, lo stato MSI, le varianti piccole di DNA e le amplificazioni geniche.

Rilevamento delle varianti di RNA

I dati indicano che non vi è interferenza di melanina (0,2 µg/ml), etanolo (5%) e xilene (0,0001%) sulle fusioni di RNA e sulle varianti di splicing. L'emoglobina (2 mg/ml) ha interferito (ridotte letture di supporto) con tre diverse varianti di splicing nel gene MET. Una variante di splicing nel gene AR (tre campioni diversi) e una nel gene EGFR (un campione) non sono state interessate. Se il laboratorio eseguisse l'RNA con il saggio, il tessuto con emoglobina deve essere evitato o ridotto al minimo quando si prelevano sezioni dal blocchetto di tessuto.

La proteinasi K (0,04 mg/ml nell'acido nucleico) ha interferito con le fusioni dell'RNA e le varianti di splicing. La proteinasi K è stata testata a 2,6 mg/ml e 5,2 mg/ml durante il processo di estrazione, che è 2 volte e 4 volte la concentrazione standard di un kit disponibile in commercio. Le fusioni sono state inibite a 4x ma non a 2x di proteinasi K. Le varianti di splicing sono state inibite a 2x di proteinasi K. La proteinasi K o un enzima equivalente non deve essere aumentata durante l'estrazione rispetto alla concentrazione standard fornita in un kit di estrazione.

La variante di splicing a supporto delle letture diminuisce con il 30% di primer indice in eccesso, ma non con il 15% in eccesso.

Necrosi

La presenza di tessuto necrotico fino al 70% non interferiva con il punteggio TMB, lo stato MSI o le varianti piccole di DNA. Le varianti di RNA (letture di supporto) e il rilevamento dell'amplificazione genica (variazione) sono stati ridotti nei campioni con contenuto necrotico rispettivamente di ≥25% e ≥23% (per area) nell'area tissutale. Se le sezioni del campione contengono ≥23% di necrosi nell'area totale del tessuto, il tessuto necrotico deve essere quindi sottoposto a macrodissezione.

Stabilità

Stabilità in tempo reale

La stabilità in tempo reale è stata utilizzata per stabilire la vita utile del kit del saggioTSO Comprehensive (UE) se conservato secondo le condizioni indicate in etichetta. Il disegno dello studio si è basato sul test di tre lotti di reagenti e ha utilizzato il disegno dello studio di stabilità classico descritto in CLSI EP25-A. I kit sono stati conservati nella configurazione finale dei kit per la durata dello studio, alle condizioni di conservazione indicate sull'etichetta del prodotto. I componenti del kit congelati sono stati conservati a una temperatura compresa tra -15 °C e -25 °C. I componenti del kit raffreddati sono stati conservati a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C.

I kit sono stati testati per valutare i criteri di rilascio del kit in termini di aspetto e funzionalità in punti temporali specifici. Inoltre, è stato analizzato l'andamento delle metriche di controllo qualità dei campioni e delle identificazioni di varianti per il materiale di controllo del controllo qualità. La vita utile è determinata per ogni reagente. Le date di scadenza sono state assegnate in base alla data di produzione e alla vita utile. La scadenza del kit viene assegnata in base al primo reagente in scadenza.

Stabilità durante l'uso del kit

La stabilità durante l'uso del kit del saggio TSO Comprehensive (UE) è stata valutata in condizioni d'uso standard nel corso della sua vita utile per valutarne il comportamento dopo vari utilizzi. Il kit di reagenti è stato sottoposto a più cicli di congelamento e scongelamento ed è testato per supportare fino a 4 utilizzi del kit. Inoltre, 8 librerie di RNA e 8 librerie di DNA sono state preparate un totale di tre volte per testare il numero massimo di librerie supportate (24 librerie di DNA e 24 librerie di RNA per ogni kit). Tutti i criteri di rilascio del kit sono stati soddisfatti per tutti i cicli di congelamento e scongelamento e per tutti i punti di tempo testati. È stata eseguita l'analisi dei campioni in FFPE con reagenti di età ≥ 25 mesi per valutare l'impatto del test durante l'uso sull'identificazione di varianti. Un'analisi qualitativa delle varianti target dimostra che gli eventi durante l'uso non influiscono sull'identificazione di varianti.

Stabilità degli acidi nucleici

La stabilità degli acidi nucleici (DNA e RNA) e la loro quantificazione associata per l'uso con il saggio TSO Comprehensive (UE) sono state valutate utilizzando campioni FFPE di più tipi di tessuto. I blocchetti in FFPE sono stati sezionati e tutti gli acidi nucleici sono stati estratti contemporaneamente. L'acido nucleico estratto è stato accuratamente miscelato, quantificato, controllato per la qualità dell'acido nucleico e suddiviso in due set di provette monouso da congelare per due punti temporali: Controllo T0 (basale) e test T1 (≥ 28 giorni). Tutto l'RNA estratto è stato conservato a una temperatura compresa tra -85 °C e -65 °C e tutto il DNA estratto è stato conservato a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per i periodi di tempo indicati, e quindi analizzato attraverso il saggio TSO Comprehensive (UE) su più replicati e operatori. La condizione del test T1 è stata confrontata con il controllo dello stato MSI, del punteggio TMB, delle amplificazioni geniche, delle varianti di DNA di piccole dimensioni, delle fusioni di RNA e delle varianti di splicing di RNA. I dati indicano che gli acidi nucleici e la loro quantificazione associata per l'uso con il saggio TSO Comprehensive (UE) sono stabili per un massimo di 28 giorni se conservati alle temperature raccomandate (RNA da -85 °C a -65 °C e DNA da -25 °C a -15 °C).

Stabilità delle librerie

La stabilità delle librerie che utilizzano ciascuno dei sei punti di arresto sicuri per il saggio (consultare la Tabella 5) è stata valutata utilizzando campioni FFPE di diversi tipi di tessuto. Le librerie di controllo (T0, nessun punto di arresto) sono state sequenziate immediatamente alla fine del flusso di lavoro. Le aliquote delle stesse librerie sono state conservate nei punti di arresto a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per il tempo (T1) a supporto dei giorni elencati nella Tabella 5. T1 è stato confrontato con T0 per varianti piccole di DNA, TMB, amplificazioni geniche, MSI, fusioni di RNA e varianti di splicing di RNA con varianti CDx e di profilazione tumorale. I dati indicano che le librerie generate dal saggio TSO Comprehensive (UE) sono stabili in conformità alle Istruzioni per l'uso.

Stabilità del tessuto in FFPE montato su vetrino

La stabilità dei tessuti in FFPE montati su vetrino da utilizzare con il saggioTSO Comprehensive (UE) è stata valutata sezionando blocchetti in FFPE (sezioni da 5 µm) provenienti da vari campioni unici, montati su vetrini e conservati a una temperatura ambiente (22 °C) per 2 intervalli di tempo. L'RNA è stato estratto e conservato a una temperatura compresa tra -65 °C e -85 °C e il DNA è stato estratto e conservato a una temperatura compresa tra -15 °C e -25 °C per meno di 1 settimana prima dell'analisi. Il materiale di acido nucleico è stato quantificato e in seguito elaborato attraverso il saggio TSO Comprehensive (UE) entro 24 ore per ciascun punto temporale. A ogni punto temporale, molteplici replicati e operatori per campione sono stati testati con il saggio TSO Comprehensive (UE) e confrontati con il punto temporale T0 per MSI, TMB, amplificazioni geniche, piccole varianti di DNA, fusioni di RNA e varianti di splicing di RNA, comprese le varianti CDx e di profilazione tumorale. Il richiamo delle varianti è stato valutato e ha soddisfatto tutti i criteri di accettazione, indicando che i tessuti FFPE montati su vetrino da utilizzare con il saggio TSO Comprehensive (UE) sono stabili a temperatura ambiente per un massimo di 4 settimane (28 giorni). Si noti che una diminuzione del 10% del tasso di validità del controllo qualità (Quality Control, QC) della libreria MSI è stata rilevata dopo 4 settimane (28 giorni) a causa di una

combinazione di operatore e tempo di conservazione. Le fusioni di RNA e le varianti di splicing hanno evidenziato una riduzione di circa il 29% delle letture di supporto dopo la conservazione sui vetrini per 4 settimane (28 giorni).

Guardband della titolazione dell'input di acido nucleico

L'input di acido nucleico per il saggio TSO Comprehensive (UE) è stato valutato analizzando il DNA ottenuto da 33 campioni in FFPE che comprendono 17 tipi di tessuto, a livelli di input che vanno da 10 ng a 500 ng e analizzando l'RNA ottenuto da 5 campioni in FFPE di 5 tipi di tessuto a livelli di input che vanno da 10 ng a 85 ng. Sono state valutate le metriche di controllo qualità delle librerie e sono dipendenti dal campione. I risultati dei campioni di DNA hanno dimostrato che alcune ma non tutte le metriche di controllo qualità del campione di DNA hanno risposto all'aumento della quantità di input rispetto all'input nominale di 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE non ha risposto a un input superiore a 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE ha mostrato una correlazione positiva con l'aumento della quantità di input.
- PCT_EXON_50X è incrementata con l'aumento della quantità di input a 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES è incrementata con l'aumento dell'input. Alcuni campioni con meno di 40 USABLE_MSI_SITES a 40 ng hanno soddisfatto la specifica con input più alti, il che consente di calcolare un punteggio MSI.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET è incrementata con l'aumento dell'input.
- L'aumento dell'input incrementa COVERAGE_MAD verso il limite della specifica superiore.

Le metriche di controllo qualità del campione di RNA sono incrementate (MEDIAN_INSERT_SIZE e TOTAL_ON_TARGET_READS) o diminuite (MEDIAN_CV_GENE_500X) da 10 ng a 40 ng ma in generale non sono cambiate tra 40 ng e 85 ng di input.

Limite del bianco

La percentuale di falsi positivi (rispetto al totale dei negativi previsti) è stata valutata mediante analisi in replica di tessuto in FFPE normale o benigno adiacente che non dovrebbe contenere varianti somatiche per varianti piccole di DNA, amplificazioni geniche, MSI, fusioni di RNA e varianti di splicing di RNA. I falsi positivi non sono stati analizzati per il TMB in quanto non vi è alcun cutoff clinico. Sono stati eseguiti in duplicati 6 campioni di DNA e 6 di RNA in FFPE da 2 diversi operatori, nel giro di 3 giorni per ognuno dei 2 lotti di reagente. Un sottoinsieme di campioni è stato ri-raggruppato in pool e risequenziato in formato 3x solo DNA e 3x solo RNA per valutare i falsi positivi con diverse configurazioni multiplex supportate da questo dispositivo. Inoltre, sono stati elaborati 30 campioni di RNA aggiuntivi in duplicato con 1 lotto di reagente e divisi tra 2 operatori. In totale sono state realizzate 168 possibili osservazioni per il DNA e 228 possibili osservazioni per l'RNA ridotte dalle librerie non valide per ogni tipo di variante. La percentuale di falsi positivi è stata calcolata a livello genico per le amplificazioni e a livello di posizione (circa 1,9 milioni di posizioni) per le varianti piccole di DNA. La percentuale di falsi positivi per i tipi di varianti di DNA è mostrata nella Tabella 46. TSO Comprehensive (UE) non presenta istanze CDx (Livello 1) per le varianti piccole di DNA, quindi non è possibile segnalare falsi positivi per le varianti piccole di DNA per il Livello 1. I 271 falsi positivi sono stati livellati da TSO Comprehensive (UE) Knowledge Base.

Nessun falso positivo è risultato clinicamente significativo (Livello 2). Ci sono stati 4 falsi positivi nel livello 3 derivanti da 2 varianti in 4 osservazioni (2,4%) su 168 osservazioni. La percentuale di falsi positivi per le fusioni di RNA e le varianti di splicing era dello 0%, come mostrato nella Tabella 47.

Tabella 46 Falsi positivi per tipo di variante di DNA

Tipo di variante	Falsi positivi
Amplificazioni geniche	0% (0/9.912)
Varianti piccole di DNA	0,0001% (271/295.801.567)
MSI	0% (0/156)
TMB	N/D*

* I falsi positivi non sono applicabili in quanto TMB viene riportato come un punteggio e non ha un esito qualitativo.

Tabella 47 Falsi positivi per tipo di variante di RNA

Tipo di variante	Falsi positivi
Fusione	0% (0/227)
Variante di splicing	0% (0/227)

Limite di rilevamento

Sono stati condotti due studi per valutare i limiti di rilevamento per TSO Comprehensive (UE). Lo Studio 1 ha valutato le varianti piccole di DNA di RET, le fusioni di RET e le fusioni di NTRK1-3 Lo Studio 2 ha valutato altre varianti del profilo del tumore.

Studio 1

Sono stati determinati i limiti di rilevamento (LoD) delle varianti piccole di DNA per NTRK1, NTRK3 e RET e delle fusioni per NTRK1-3 e RET. Il LoD è il valore più basso dell'analita (ad esempio la frequenza allelica delle varianti o le letture di supporto) rilevabile in modo coerente (limite di rilevamento al 95% o errore di tipo II del 5%). Nello studio sono stati utilizzati i tessuti in FFPE con varianti piccole di DNA di RET (carcinoma midollare della tiroide), le fusioni di RET (tumore papillare della tiroide, nevo di Spitz atipico) e le fusioni di NTRK1-3 (glioma di basso grado, glioblastoma multiforme, sarcoma miofibroblastico, sarcoma, carcinoma mammario secretorio, tumore al colon) e anche una linea cellulare trattata in FFPE con le varianti piccole di DNA di NTRK1 e NTRK3. Ogni campione è stato diluito ad almeno 5 livelli del test (da circa 0,01 a 0,10 VAF per le varianti piccole di DNA e circa 2-25 letture di supporto per le fusioni). Sono state effettuate 18 osservazioni per ogni livello del test per lotto e per variante generate da 3 operatori e 3 strumenti di sequenziamento iniziando la preparazione delle librerie in 3 giorni non consecutivi con 2 replicati per ogni livello del test del campione. Sono stati analizzati due lotti di reagente.

Per le varianti di DNA, i 2 lotti sono stati analizzati indipendentemente utilizzando la regressione probit o l'approccio di tasso di successo (livello di analisi più basso con un tasso di successo, stima punto, di ≥ 95%) per determinare il LoD per ogni variante per lotto. Come limite di rilevamento per la variante è stato preso il valore LoD più ampio sui due lotti di reagente (Tabella 48).

Per le fusioni di RNA, sono state utilizzate le linee cellulari in FFPE per stimare i valori LoD per ogni gene di fusione. I valori LoD sono stati verificati con tessuti in FFPE utilizzando le preparazioni delle librerie duplicate da 3 operatori, 3 strumenti e 3 lotti di reagente per generare 54 osservazioni per variante in prossimità del LoD stabilito con le linee cellulari in FFPE. Il limite di rilevamento indicato per ogni fusione (Tabella 49) rappresentano le letture di supporto medie più basse che hanno raggiunto un tasso di successo (stima punto) di ≥95%.

Tabella 48 Limite di rilevamento delle varianti piccole di DNA per NTRK1, NTRK3 e RET

Marcatore	Chr[1]	Posizione	Riferimento	Alternativo	Limite di rilevamento (Frequenza allelica delle varianti)
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 (delezione)[2]	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

[1] Chr = Cromosoma
[2] Queste varianti di DNA sono state analizzate mediante la regressione probit; le altre varianti di DNA sono state analizzate mediante un approccio basato sul tasso di successo.

Tabella 49 Limite di rilevamento per le fusioni di NTRK e RET

Gene	Fusione	Limite di rilevamento (letture di supporto)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2

Gene	Fusione	Limite di rilevamento (letture di supporto)
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Studio 2

Sono stati valutati i limiti di rilevamento (LoD) delle varianti del profilo tumorale riportate da TSO Comprehensive (UE). Il LoD è il valore più basso dell'analita (frequenza allelica delle varianti, variazione o letture di supporto) rilevabile in modo coerente (tasso di successo al 95% o errore di tipo II del 5%). I campioni in FFPE ottenuti da 17 tipi di tessuto contenenti varianti sono stati diluiti a molteplici livelli di test. Due operatori hanno generato sei osservazioni per livello, ciascuno utilizzando un lotto di reagente e uno strumento diversi.

Varianti di DNA

I valori LoD di 10 classi di varianti piccole di DNA (25 varianti in totale) e 2 amplificazioni geniche di DNA (ERBB2 e MET) sono stati determinati e riepilogati come intervalli (Tabella 50). Sono incluse anche le varianti di RET del LoD dello Studio 1. Due delle 3 inserzioni superiori a 5 bp avevano valori LoD di 0,034 e 0,036 VAF e la terza aveva un valore LoD di 0,215 VAF. Quest'ultima era un'inserzione in una regione a bassa complessità in cui l'inserzione aggiunge ulteriori ripetizioni, incide sull'allineamento e richiede più letture per un rilevamento coerente. Pertanto, alcuni contenuti genomici a bassa complessità potrebbero influire sul rilevamento di inserzioni >5 bp.

Tabella 50 Limite di rilevamento per varianti piccole di DNA e amplificazioni geniche

Tipo (unità di misura del LoD)	Classe di variante/ Contenuto genomico	Numero di varianti	Intervallo (VAF)
Varianti piccole di DNA (frequenza allelica delle varianti)	SNV	5	0,016-0,064
	MNV	3	0,022-0,048
	Inserzione (1-2 bp) prossima a ripetizioni omopolimeriche	2	0,086-0,104
	Inserzione (1-2 bp) prossima a ripetizioni dinucleotidiche	2	0,038-0,051
	Inserzione (3-5 bp)	2	0,030-0,056
	Inserzione (> 5 bp e fino a 25 bp)	3	0,034-0,215
	Delezione (1-2 bp) prossima a ripetizioni omopolimeriche	2	0,094-0,100
	Delezione (1-2 bp) prossima a ripetizioni dinucleotidiche	2	0,033-0,070
	Delezione (3-5 bp)	2	0,028-0,064
	Delezione (> 5 bp e fino a 25 bp)	2	0,047-0,055
Amplificazioni geniche (variazione)	Per gene (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

L'analisi delle varianti non target è stata eseguita da campioni dello Studio 1 che presentavano almeno cinque livelli di analisi. Ciascuna variante non mirata è stata analizzata individualmente e un LoD stimato solo per le varianti con almeno un livello >0% e ≤95% di tasso di successo e almeno un livello ≥95% di tasso di successo. Tabella 51 mostra i percentili insieme ai LoD minimi e massimi osservati per classe per le varianti non target. Le varianti non target forniscono più varianti per classe di quelle testate nello Studio 2 e sono coerenti con gli intervalli LoD della Tabella 50.

Tabella 51 Statistiche riassuntive per i limiti di rilevamento per classe di varianti non target (dallo Studio 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
Inserzione	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Delezione	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Fusioni

I valori LoD sono stati determinati per 19 fusioni, che rappresentano 20 geni nel pannello TSO Comprehensive (UE), con un intervallo da 9 a 31,3 letture di supporto (Tabella 52). Ulteriori 3 geni (NTRK1–3) sono stati analizzati nell'altro studio. Il gene RET è stato analizzato sia in questo studio che nell'altro studio. Sedici fusioni con valori LoD determinati presentavano coerenza nei dati con un valore LoD comune di 16 letture di supporto utilizzando un limite di confidenza superiore (UCL) bilaterale al 95%. Due fusioni avevano valori LoD di 24,7 e 31,3 di letture di supporto che non erano coerenti con il valore LoD comune.

La fusione FGFR2-SRPK2 con un valore LoD di 24,7 di letture di supporto aveva regioni di sovrapposizione ripetute nel breakpoint come annotato dal software del saggio TSO Comprehensive (UE). Di solito, le regioni di ripetizione entro un breakpoint hanno livelli di evidenza inferiori in quanto le letture potrebbero mapparsi altrove nel genoma o potrebbero rimanere non allineate. Inoltre, le regioni di ripetizione rendono il processo di raggruppamento (utilizzato per identificare le sequenze delle fusioni) più difficile e richiedono ulteriori evidenze per costruire la sequenza corretta. SEPT14-EGFR è un altro esempio di una fusione con sequenza omologa nel breakpoint.

La fusione BCL2-IGHJ5 con un valore LoD di 31,3 di letture di supporto aveva un gene molto corto (IGHJ5) con il breakpoint prossimo all'inizio di un esone che richiede allineamenti dei vuoti di copertura brevi. Di conseguenza, per eseguire un rilevamento coerente era richiesto un numero maggiore di letture.

Tabella 52 Limite di rilevamento per le fusioni

Fusione	Breakpoint A del gene	Breakpoint B del gene	LoD	LoD comune
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	sì
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	sì
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	sì
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	sì
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	sì
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	sì
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	sì
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	sì

Fusione	Breakpoint A del gene	Breakpoint B del gene	LoD	LoD comune
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	sì
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	sì
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	no
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	sì
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	sì
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	sì
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	sì
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	sì
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	sì
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	no
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	sì

Varianti di splicing

Le due varianti di splicing di RNA (MET e EGFR) avevano un valore LoD di 18,7 e 16,7 letture di supporto, rispettivamente.

Contenuto di tumore

I risultati dello studio forniscono informazioni sulle raccomandazioni per il contenuto di tumore per i campioni clinici. In generale, maggiore è il contenuto di tumore, maggiore sarà il segnale (VAF, fold-change o letture di supporto) per le varianti nel tumore. Le raccomandazioni sul contenuto minimo di tumore si basano sulle seguenti osservazioni. I valori LoD per le varianti piccole di DNA non superano 0,104 VAF (fatta eccezione dell'inserzione TP53). Per rilevare le mutazioni "driver" nel tumore (frequenza allelica delle varianti 0,50), si raccomanda un contenuto di tumore del 20%; in questo modo queste mutazioni dovrebbero avere un valore VAF di 0,10 e avere un valore pari o superiore a LoD. Con un contenuto di tumore del 20%, i geni amplificati a 5,5 di variazione (11 copie) dovrebbero essere rilevati in modo coerente in base a un limite di rilevamento di 1,8 di variazione. Con contenuto di tumore del 20%, le fusioni con 74 letture di supporto dovrebbero essere rilevate in modo coerente in base a un limite di rilevamento di 14,7 letture di supporto.

Riproducibilità

Sono stati condotti due studi per valutare la riproducibilità per il saggio TSO Comprehensive (UE). Lo Studio 1 ha valutato le varianti piccole di DNA di RET oltre alle varianti delle fusioni di NTRK e RET. Lo Studio 2 ha valutato ulteriori varianti del profilo del tumore.

Studio 1

Questo studio è stato eseguito per valutare la riproducibilità del saggio TSO Comprehensive (UE) in 3 siti di analisi (1 interno, 2 esterni) con 2 operatori per sito, 2 replicati entro la corsa e 3 giorni di analisi non consecutivi. L'analisi è stata condotta con un pannello di riproducibilità che includeva campioni di DNA contenenti determinate varianti piccole di DNA di RET note e campioni di RNA contenenti determinate varianti di fusione di NTRK1-3 e RET note da campioni di tessuto in FFPE e linee cellulari. Il pannello conteneva componenti del pannello di DNA e di RNA con livelli di variante basso e alto con lo stesso numero di componenti del pannello di livello basso e alto per ogni classe di variante. I componenti del pannello di livello alto sono stati individuati a circa due o tre volte del valore LoD e i componenti del pannello di livello basso sono stati individuati all'incirca al valore LoD. In ogni sito, ogni operatore ha analizzato i componenti del pannello in duplicati 3 volte, generando 6 osservazioni per target per componente del pannello. In tutti e 3 i siti, sono state generate 36 osservazioni per componente del pannello (3 siti/strumenti × 2 operatori × 2 replicati entro la corsa × 3 giorni di avvio).

Le PPC e le PNC per le varianti piccole di DNA target e le varianti di fusioni di RNA target a livello alto sono state determinate come endpoint principali. Le PPC e le PNC per le varianti piccole di DNA target e per le varianti di fusione di RNA target a livello basso sono state calcolate come endpoint secondari. Gli intervalli di confidenza (IC) bilaterali al 95% associati a tutti gli endpoint sono stati calcolati utilizzando il metodo del punteggio di Wilson. L'analisi primaria è stata eseguita per stimare la PPC e la PNC (con IC al 95% associato) nei componenti del pannello a livello alto combinando le osservazioni del saggio TSO Comprehensive (UE) per un dato target in un gruppo di componenti del pannello che rappresentavano la classe di variante applicabile (ad esempio, varianti piccole di DNA e fusioni di RNA) su siti/strumenti, operatori e corse. Per ogni variante target, le osservazioni del saggio TSO Comprehensive (UE) in altri componenti del pannello target a livello alto per lo stesso tipo di variante ma non contenente la stessa variante, come determinato dalla regola della maggioranza, sono state combinate per calcolare la PNC. La PPC e la PNC complessive per i componenti del pannello target a livello basso sono state determinate in modo simile.

Varianti piccole di DNA di RET

Per i componenti del pannello delle varianti piccole di DNA di alto livello, la PPC complessiva era del 100,0% (207/207; IC al 95%: da 98,2% a 100,0%) (Tabella 53). Per i componenti del pannello delle varianti piccole di DNA di alto livello, la PNC complessiva era del 100,0% (1.035/1.035; IC al 95%: da 99,6% a 100,0%) (Tabella 54). Per i componenti del pannello delle varianti piccole di DNA target di basso livello, la PPC era del 99,1% (210/212; IC al 95%: da 96,6% a 99,7%) e la PNC complessiva era del 100,0% (1.026/1.026; IC al 95%: da 99,6% a 100,0%).

Tabella 53 PPC del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento delle varianti piccole di DNA di RET in componenti del pannello target di alto livello e di basso livello

Livello variante	Tipo di variante	Variante target (nucleotide)	Variante target (aminoacido)	N.	VAF media[1]	PPC (%) (n/N)	IC al 95%[2]
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Delezione	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Inserzione	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Tutte le varianti piccole di DNA "high"	Tutte le varianti piccole di DNA "high"	Tutte le varianti piccole di DNA "high"	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)
	Delezione	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Inserzione	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Tutte le varianti piccole di DNA "low"	Tutte le varianti piccole di DNA "low"	Tutte le varianti piccole di DNA "low"	212	N/A[1]	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

[1] Abbreviazioni: N/D, non applicabile; VAF, frequenza allelica delle varianti (Variant Allele Frequency).
[2] L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

Tabella 54 PNC del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento delle varianti piccole di DNA di RET in componenti del pannello target di alto livello e di basso livello

Livello variante	Tipo di variante	Variante target (nucleotide)	Variante target (aminoacido)	N[1]	PNC (%) (n/N)	IC al 95%[2]
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Delezione	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Inserzione	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Tutte le varianti piccole di DNA "high"	Tutte le varianti piccole di DNA "high"	Tutte le varianti piccole di DNA "high"	1.035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Delezione	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Inserzione	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Tutte le varianti piccole di DNA "low"	Tutte le varianti piccole di DNA "low"	Tutte le varianti piccole di DNA "low"	1.026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

[1] Tutte le osservazioni raggruppate in pool dalle combinazioni componente-variante del pannello per le quali la maggior parte delle identificazioni era negativa (varianti target contenenti le fusioni con meno del 50% di identificazioni positive).
[2] L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

La Tabella 55 mostra l'analisi dei componenti della variazione delle frequenze alleliche delle varianti (VAF) su circa 36 osservazioni per ogni componente del pannello. La deviazione standard (DS) e la percentuale del coefficiente di variazione (%CV; totale e per ogni fonte) sono state calcolate e presentate per ogni variante piccola di DNA di RET.

Tabella 55 Analisi dei componenti della variazione del saggio TSO Comprehensive (UE) delle frequenze VAF nei componenti del pannello delle varianti piccole di DNA target

Livello variante	Tipo di variante	Variante target (nucleotide)	Variante target (amminoacido)	N.	VAF media	DS sede (%CV)	DS operatore (%CV)	DS giorno (%CV)	DS replicati (%CV)	DS totale (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Delezione	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)
	Inserzione	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)
	Delezione	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)
	Inserzione	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)

Fusioni di NTRK 1-3 e RET

Per i componenti del pannello delle fusioni di RNA a livello alto, la PPC complessiva era del 99,3% (285/287; IC al 95%: da 97,5% a 99,8%) (Tabella 56). La PPC era del 100% per ogni componente del pannello a livello alto, fatta eccezione per il componente del pannello BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; IC al 95%: da 81,9% a 98,5%]). La PNC complessiva per i componenti del pannello delle fusioni di RNA a livello alto era del 100,0% (1.724/1.724; IC al 95%: da 99,8% a 100,0%) (Tabella 57). La PPC complessiva per i componenti del pannello delle fusioni di RNA target di livello basso era del 95,4% (272/285; IC al 95%: 92,3%, 97,3%) e la PNC complessiva era del 100,0% (1.851/1.851; IC al 95%: da 99,8% a 100,0%).

Tabella 56 PPC del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento delle fusioni di NTRK e RET in componenti del pannello target di alto livello e di basso livello

Livello variante	Fusione target	N.	Media letture di supporto	PPC (%) (n/N)	IC al 95%*
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Tutte le fusioni livello alto	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)
	Tutte le fusioni a livello basso	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* L'intervallo di confidenza (IC) bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

Tabella 57 PNC del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento delle fusioni di NTRK e RET in componenti del pannello non target di alto livello e di basso livello

Livello variante	Fusioni target	N[1]	PNC (%) (n/N)	IC al 95%[2]
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Tutte le fusioni - livello alto	1.724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Tutte le fusioni - livello basso	1.851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

[1] Tutte le osservazioni raggruppate in pool dalle combinazioni componente-variante del pannello per le quali la maggior parte delle identificazioni era negativa (varianti target contenenti le fusioni con meno del 50% di identificazioni positive).
[2] L'intervallo di confidenza (IC) bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

La Tabella 58 mostra l'analisi dei componenti della variazione delle letture di supporto su circa 36 osservazioni entro ogni fusione target. La DS e la %CV (totale per ogni fonte) è stata calcolata e presentata per ogni fusione target.

Tabella 58 Analisi dei componenti della variazione del saggio TSO Comprehensive (UE) delle letture di supporto nei componenti del pannello delle fusioni di RNA target

Livello variante	Fusione	N.	Media letture di supporto	DS sede (%CV)	DS operatore (%CV)	DS giorno (%CV)	DS replicati (%CV)	DS totale (%CV)
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9)	3,37 (9)	6,93 (18)	9,04 (24)	12,39 (33)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41)	7,87 (23)	5,40 (16)	8,95 (27)	18,98 (57)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33)	3,50 (14)	4,20 (17)	4,86 (20)	10,86 (44)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31)	4,24 (12)	6,82 (19)	6,87 (19)	15,57 (43)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20)	10,20 (18)	9,25 (16)	8,69 (15)	19,93 (35)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5)	2,65 (8)	2,16 (7)	10,47 (32)	11,11 (34)
	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13)	4,09 (11)	6,17 (17)	5,20 (14)	10,17 (28)
	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22)	2,56 (8)	6,53 (20)	5,51 (16)	11,49 (34)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13)	0,00 (0)	2,74 (20)	4,37 (32)	5,47 (40)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17)	2,98 (18)	4,61 (27)	5,82 (34)	8,52 (50)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0)	3,41 (22)	3,83 (25)	4,39 (29)	6,75 (45)
	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13)	0,61 (5)	2,33 (17)	2,57 (19)	3,95 (29)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24)	3,46 (14)	0,00 (0)	6,39 (26)	9,44 (38)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,64 (37)	6,71 (37)
	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13)	1,03 (7)	0,00 (0)	5,11 (32)	5,61 (36)
	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12)	0,00 (0)	1,58 (10)	5,83 (35)	6,39 (39)

Studio 2

È stato eseguito un secondo studio per valutare la riproducibilità del saggio TSO Comprehensive (UE) in 3 siti di analisi (2 esterni e 1 interno), 2 operatori/strumenti per sito, 3 lotti di reagente unici, 4 giorni di analisi (non consecutivi) e 2 corse di sequenziamento per libreria di campioni.

L'analisi è stata condotta utilizzando campioni di DNA e RNA estratti da 41 campioni di tessuto in FFPE e 1 linea cellulare in FFPE (con 1 campione di tessuto in FFPE e la linea cellulare in FFPE usata per creare 2 componenti del pannello ciascuno). I campioni di tessuto consistevano dei seguenti tipi: vescica, osso, cervello, mammella, colon, digiuno, rene, fegato, polmone, ovario, prostata, cute, tessuto molle, stomaco, tiroide e utero. È stato analizzato un totale di 44 componenti del pannello inclusi i componenti del pannello di DNA con varianti piccole di DNA (SNV, MNV, inserzioni e delezioni), amplificazioni geniche, diversi punteggi TMB, punteggi MSI-High e i componenti del pannello di RNA con fusioni e varianti di splicing. La maggior parte dei componenti del pannello presentavano varianti target a livelli di circa 2 e 3 volte il limite di rilevamento specifico per la variante (~2-3×LoD).

Il valore LoD è la concentrazione dell'analita dove i risultati osservati del saggio sono positivi (variante rilevata rispetto al cutoff del saggio TSO Comprehensive (UE)) ≥ 95% delle volte. I livelli di variante medi osservati sono stati categorizzati a circa < 2×LoD (livelli di variante osservati < 1,5×LoD), ~2-3×LoD (livelli di variante osservati da 1,5×LoD a 3,4×LoD) e circa > 3×LoD (livelli di variante osservati a > 3,4×LoD).

Le PPC per varianti piccole di DNA, amplificazioni geniche, MSI-High e varianti di RNA sono state calcolate combinando le osservazioni su corse e siti di sequenziamento. Le PNC sono state calcolate in modo simile per varianti piccole di DNA, amplificazioni geniche e varianti di RNA. Per ogni variante target nota, le osservazioni del saggio TSO Comprehensive (UE) nei componenti del pannello per lo stesso tipo di variante ma contenente altre varianti, non derivate da campioni della medesima origine, che non soddisfacevano la maggior parte delle regole per quella variante (ossia, <50% delle identificazioni erano positive) sono state combinate tra siti, operatori/strumenti, giorni, lotti di reagente e corse di sequenziamento per calcolare la PNC. Gli intervalli di confidenza (IC) bilaterale al 95% sono stati calcolati utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

Varianti piccole di DNA

La Tabella 59 mostra la PPC per le varianti piccole di DNA target. Le PPC andavano dal 91,3% per una SNV BRAF al 100% per la maggior parte delle varianti piccole di DNA.

Tabella 59 PPC del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento delle varianti piccole di DNA nei componenti del pannello target combinati

Livello variante osservato[1]	Tipo di variante	Variante target (nucleotide)	Variante target (aminoacido)	VAF media[2]	PPC (%) (n/N)	IC al 95%[3]
~2-3x LoD	DELEZIONE	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2-3x LoD	DELEZIONE	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERZIONE	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
~2-3x LoD	INSERZIONE	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
<2x LoD	INSERZIONE	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2-3x LoD	DELEZIONE	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)

Livello variante osservato[1]	Tipo di variante	Variante target (nucleotide)	Variante target (aminoacido)	VAF media[2]	PPC (%) (n/N)	IC al 95%[3]
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	DELEZIONE	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	INSERZIONE	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	INSERZIONE	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	DELEZIONE	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
<2x LoD	INSERZIONE	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERZIONE	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

[1] Il livello della variante calcolato dalla media della frequenza allelica delle varianti osservata.
[2] La frequenza allelica delle varianti media calcolata dai risultati del saggio osservati.
[3] L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

La PNC era del 100% sulle varianti piccole di DNA.

La Tabella 60 mostra l'analisi dei componenti della variazione dei risultati VAF per ogni fonte di variazione e la variazione totale in tutti i componenti del pannello con le varianti piccole di DNA target.

Tabella 60 Analisi dei componenti della variazione di VAF per le varianti piccole di DNA target

Variante target (nucleotide)	N.	VAF media	DS sede (%CV)	DS operatore (sede) (%CV)	DS giorno (sede, operatore) (%CV)	DS lotto (%CV)	DS corsa (%CV)	DS totale (%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)

Erano presenti due varianti piccole di DNA target per le quali il numero di osservazioni era troppo piccolo per essere adattato a un modello di componenti di variazione. Per queste due varianti target, la DS complessiva era di 0,027 per la variante chr1_27024001_C_CG e 0,001 per la variante chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Amplificazioni geniche

La Tabella 61 mostra la PPC per le amplificazioni geniche target. Le PPC erano il 100,0% per MET e 100,0% per ERBB2.

Tabella 61 PPC del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento delle amplificazioni geniche in combinazione con componenti del pannello target

Livello variante osservato[1]	Variante target	Fold-change medio osservato[2]	Percentuale identificazioni positive (%)	IC al 95%[3]
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

[1] Il livello della variante calcolato dal fold-change medio osservato.
[2] Il fold-change medio calcolato dai risultati del saggio osservati.
[3] L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

Le PNC erano il 100% sulle amplificazioni geniche.

La Tabella 62 mostra l'analisi dei componenti della variazione dei risultati del fold-change per ogni fonte di variazione e la variazione totale in tutti i componenti del pannello con le amplificazioni geniche target.

Tabella 62 Analisi dei componenti della variazione del fold-change per le amplificazioni geniche target

Variante target	N.	Fold-change medio	DS sede (%CV)	DS operatore (sede) (%CV)	DS giorno (sede, operatore) (%CV)	DS lotto (%CV)	DS corsa (%CV)	DS totale (%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

La Tabella 63 mostra la PPC per i componenti del pannello MSI-High target. Le PPC erano il 100% per entrambi i componenti del pannello MS-High.

Tabella 63 PPC del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento dello stato MSI-High nei componenti del pannello target combinati

Componente del pannello	Punteggio MSI medio[1]	N.	Percentuale identificazioni positive (%)	IC al 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)
Tutti i componenti		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

[1] Il punteggio MSI medio osservato calcolato dai risultati del saggio osservati.
[2] L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

La Tabella 64 mostra l'analisi dei componenti della variazione dei risultati dei punteggi MSI per ogni fonte di variazione e la variazione totale in tutti i componenti del pannello target per lo stato di MSI-High.

Tabella 64 Analisi dei componenti della variazione del punteggio MSI per i componenti del pannello MSI-High target

Componente del pannello	N.	Punteggio MSI medio	DS sede (%CV)	DS operatore (sede) (%CV)	DS giorno (sede, operatore) (%CV)	DS lotto (%CV)	DS corsa (%CV)	DS totale (%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

Per valutare la riproducibilità dei punteggi TMB, è stata condotta un'analisi quantitativa del punteggio nei componenti del pannello TMB target, che rappresentava un intervallo dei punteggi TMB previsti. La Tabella 65 mostra l'analisi dei componenti della variazione dei risultati dei punteggi TMB per ogni fonte di variazione e la variazione totale nei componenti del pannello TMB. Le DS totali del punteggio TMB erano pari a 1,0 (%CV = 13) per un componente del pannello (punteggio medio TMB = 7,6) e 1,1 (%CV = 2) per un altro componente del pannello (punteggio medio TMB = 63,2).

Tabella 65 Analisi dei componenti della variazione del punteggio TMB per i componenti del pannello TMB target

Componente del pannello*	N.	Punteggio medio TMB	DS sede (%CV)	DS operatore (sede) (%CV)	DS giorno (sede, operatore) (%CV)	DS lotto (%CV)	DS corsa (%CV)	DS totale (%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)

* Era presente 1 componente del pannello TMB per il quale il numero di osservazioni era troppo piccolo (N = 2) per essere adattato a un modello di componenti di variazione. Per questo componente del pannello, la DS complessiva era 1,7.

Varianti di RNA

La Tabella 66 mostra la PPC per le varianti di RNA target. Le PPC andavano dal 91,7% per KIF5B-RET al 100% per la maggior parte delle varianti di RNA.

Tabella 66 PPC del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento delle varianti di RNA nei componenti del pannello target combinati

Livello variante osservato[1]	Tipo di variante	Variante target	Media letture di supporto[2]	PPC (%) (n/N)	IC al 95%[3]
>3x LoD	Fusione	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusione	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusione	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusione	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusione	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusione	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusione	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3x LoD	Fusione	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusione	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusione	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fusione	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusione	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusione	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusione	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fusione	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
<2x LoD	Fusione	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Fusione	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
>3x LoD	Variante di splicing	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3x LoD	Variante di splicing	Skipping dell'esone 14 di MET	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

[1] Il livello della variante calcolato dalle letture di supporto medie osservate.
[2] Le letture di supporto medie calcolate dai risultati del saggio osservati.
[3] L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è calcolato utilizzando il metodo del punteggio di Wilson.

La PNC era del 100% per ogni variante di RNA target, fatto salvo il caso della fusione di FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60% (984/988; IC al 95%: da 98,96% a 99,84%).

La Tabella 67 mostra l'analisi dei componenti della variazione dei risultati delle letture di supporto per ogni fonte di variazione e la variazione totale in tutti i componenti del pannello con le varianti di RNA target.

Tabella 67 Analisi dei componenti della variazione delle letture di supporto per le varianti di RNA target

Variante target	N.	Media letture di supporto	DS sede (%CV)	DS operatore (sede) (%CV)	DS giorno (sede, operatore) (%CV)	DS lotto (%CV)	DS corsa (%CV)	DS totale (%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)
Variante di splicing EGFR vIII	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Variante di splicing con skipping dell'esone 14 di MET	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Precisione all'interno del laboratorio

Sono stati condotti due studi per valutare la precisione all'interno del laboratorio per TSO Comprehensive (UE). Lo Studio 1 ha valutato le fusioni di NTRK, le fusioni di RET e le varianti piccole di DNA di RET. Lo Studio 2 ha valutato TMB e MSI.

Studio 1

È stata valutata la precisione all'interno del laboratorio per le fusioni di NTRK1-3 (glioma di grado inferiore, glioblastoma multiforme, sarcoma miofibroblastico, carcinoma mammario secretorio), le fusioni di RET (carcinoma tiroideo e tessuto cutaneo da tumore sconosciuto) e le varianti piccole di DNA di RET (carcinoma midollare della tiroide) con tessuti in FFPE dai tumori indicati. Ogni campione è stato analizzato a due livelli di variante: ~1x LoD (livello basso di variante) e ~2-3x LoD (livello alto di variante) ad eccezione del campione

contenente CCDC6-RET che è stato analizzato solo a livello basso di variante. Ogni campione a ogni livello di analisi è stato testato in duplicati in ogni evento di preparazione delle librerie con tre (3) operatori. Ogni operatore ha iniziato la preparazione delle librerie in tre (3) giorni di avvio non consecutivi ed eseguito il sequenziamento su tre (3) strumenti NextSeq 550Dx designati. Sono stati analizzati tre (3) lotti di reagente che hanno generato 54 osservazioni per livello. Alcuni livelli presentavano meno di 54 osservazioni a causa di librerie non valide.

Analisi qualitativa

La concordanza qualitativa dell'identificazione delle varianti è stata valutata separatamente per i due livelli di variante per una data variante da osservazioni raggruppate in pool su tutte le variabili (operatori, lotti di reagente, strumenti, giorni e replicati). Le PPC e le PNC e il relativo intervallo di confidenza bilaterale al 95% (punteggio di Wilson) sono riassunte nella Tabella 68 (varianti piccole di DNA) e nella Tabella 69 (fusioni di RNA).

Al livello alto di variante (~2-3x LoD), il saggio TSO Comprehensive (UE) ha mostrato il 100% per PPC e PNC per tutte le varianti analizzate.

Al livello basso di variante (circa 1x LoD), PPC per le varianti piccole di DNA andava dall'83,3% al 98,1% e PPC per le fusioni di RNA andava da 90,7% al 100%. Per le varianti con PPC < 95%, il valore VAF medio (RET C634Y e RET D898_E901del) o le letture di supporto (NCOA4-RET e BCAN-NTRK1) erano inferiori ai rispettivi limiti di rilevamento. Al livello basso di variante, è stato ottenuto il 100% di PNC per tutte le varianti.

Tabella 68 Risultati qualitativi per le varianti target di DNA

Livello variante	Variante	Tipo di variante	VAF media	PPC (%) (n/N) (IC al 95%)	PNC (%) (n/N) (IC al 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	DELEZIONE	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*	DELEZIONE	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Livello variante	Variante	Tipo di variante	VAF media	PPC (%) (n/N) (IC al 95%)	PNC (%) (n/N) (IC al 95%)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	DELEZIONE	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*	DELEZIONE	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Nella sezione Limite di rilevamento sono elencate le modifiche del nucleotide per ogni variante, fatta eccezione per RET D631_L633delinsE, che è Cromosoma 10, Posizione 43609940, Riferimento ACGAGCT, Alternativo A.

Tabella 69 Risultati qualitativi per le fusioni target di RNA

Livello variante	Fusione	Media letture di supporto	PPC (%) (n/N) (IC al 95%)	PNC (%) (n/N) (IC al 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 (linea cellulare in 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 (Campione 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (Campione 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Livello variante	Fusione	Media letture di supporto	PPC (%) (n/N) (IC al 95%)	PNC (%) (n/N) (IC al 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 (linea cellulare in 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	N/D	Non analizzato	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (Campione 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (Campione 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Analisi quantitativa

L'analisi dei componenti della variazione per la massima verosimiglianza ristretta (REML, Restricted maximum likelihood) è stata eseguita per valutare la variazione totale della variabile continua sottostante (VAF per varianti piccole di DNA e letture di supporto per fusioni di RNA) e sono stati stimati i componenti di precisione [deviazione standard (DS), coefficiente di variazione (CV)] per ogni fonte di variazione [operatori, strumenti, giorni, lotti di reagente, residuo o totale]. I risultati sono illustrati nella Tabella 70 per le varianti piccole di DNA e nella Tabella 71 per le fusioni di RNA.

La variazione nel valore VAF è aumentata con la media come previsto per una proporzione binomiale. La variazione nelle letture di supporto è aumentata con la media come previsto con i dati del conteggio. Il componente residuo rappresentava il maggior contributo per la variazione totale sia per le varianti piccole di DNA che per le fusioni di RNA ad entrambi i livelli e supporta la conclusione che il rilevamento di queste varianti da parte di TSO Comprehensive (UE) è efficace per operatori, lotti, strumenti e giorni.

Tabella 70 Risultati quantitativi DS e CV per le varianti piccole di DNA target

Livello VAF	Variante	Tipo di variante	N. tentativi validi	VAF media	DS operatore (%CV)	DS strumento (%CV)	DS lotto (%CV)	DS giorno (%CV)	DS residua (%CV)	DS totale (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELEZIONE	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	DELEZIONE	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
~3x LoD	RET D898_E901del	DELEZIONE	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	DELEZIONE	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)

Tabella 71 Risultati quantitativi DS e CV per le fusioni target di RNA

Livello letture di supporto	Fusione	N. tentativi validi	Media letture di supporto	DS operatore (%CV)	DS strumento (%CV)	DS lotto (%CV)	DS giorno (%CV)	DS residua (%CV)	DS totale (%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 (linea cellulare)	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 (Campione 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (Campione 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Livello letture di supporto	Fusione	N. tentativi validi	Media letture di supporto	DS operatore (%CV)	DS strumento (%CV)	DS lotto (%CV)	DS giorno (%CV)	DS residua (%CV)	DS totale (%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 (linea cellulare)	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 (Campione 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (Campione 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Studio 2

La precisione all'interno del laboratorio è stata valutata per TMB e MSI. Per valutare la precisione a diversi livelli su un intervallo di punteggi sono stati utilizzati cinque campioni di DNA in FFPE NSCLC per TMB e sette campioni in FFPE CRC per MSI, inclusi MS-Stable e MSI-High. Ogni campione è stato analizzato in duplicati con tre (3) operatori, in tre (3) giorni, con tre (3) preparazioni delle librerie per tre (3) lotti di reagente utilizzando tre strumenti NextSeq 550Dx e hanno generato 54 osservazioni per livello.

La concordanza qualitativa è stata valutata per lo stato MSI. Il saggio TSO Comprehensive (UE) ha dimostrato una concordanza del 100% per la percentuale di identificazioni positive e per la percentuale di identificazioni negative per lo stato MSI. Per TMB, il saggio TSO Comprehensive (UE) riporta un punteggio TMB; la concordanza qualitativa non è applicabile.

La variazione totale del punteggio TMB e MSI, assieme al contributo della fonte (strumenti, operatori, lotti, giorni e residuo), sono stati quantificati utilizzando un modello dei componenti della variazione su un intervallo di punteggi. La deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV) sono presentati, per livello, nella Tabella 72 per TMB e nella Tabella 73 per MSI. Alcuni livelli presentavano meno di 54 osservazioni a causa di librerie non valide.

Tabella 72 Risultati DS e CV per il punteggio quantitativo TMB

Livello	Punteggio medio TMB	N. tentativi validi	DS operatore (%CV)	DS strumento (%CV)	DS lotto (%CV)	DS del giorno (%CV)	DS residua (%CV)	Totale DS (%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)

Tabella 73 Risultati DS e CV per il punteggio quantitativo MSI

Stato MSI	Livello	Punteggio MSI medio (%)	N tentativi validi	DS operatore (%CV)	DS strumento (%CV)	DS lotto (%CV)	DS giorno (%CV)	DS residua (%CV)	Totale DS (%CV)
MS stabile	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 alto	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 variazione nei punteggi TMB tende ad aumentare con la media prevista dalle distribuzioni teoriche dei dati del conteggio. La variazione nei punteggi MSI per i livelli prossimi al punteggio MSI = 50 sono maggiori rispetto alla variazione dei punteggi MSI prossimi allo 0, o 100 coerenti con la variabilità dalle distribuzioni teoriche dei dati della proporzione. Il componente residuo rimane il contributo più grande per la variazione totale sia per punteggi MSI che per i punteggi TMB a supporto della conclusione che i punteggi sono efficaci per operatori, lotti, strumenti e giorni. Tuttavia, sia MSI che TMB sono biomarcatori complessi, e le prestazioni analitiche potrebbero variare da campione a campione. Ossia, la variazione TMB non dipende solo dal valore TMB ma anche dalla composizione delle varianti nel campione, come il tipo di variante (SNV, Indel) e il livello VAF (prossimità al cutoff di inclusione). Nello stesso modo, la variazione MSI non dipende solo dal valore MSI ma anche dalla composizione dei siti nel campione, come il numero di siti instabili e la quantità di instabilità per sito.

I valori C5 e C95 intorno al cutoff del 20,00% sono stati determinati per MSI utilizzando un profilo di precisione (Tabella 74).

Tabella 74 Intervallo C5-C95 per MSI

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

È stato valutato l'impatto del contenuto di tumore sui punteggi TMB e MSI. Per la maggior parte dei campioni, il contenuto di tumore di ≥ 30% aveva un impatto trascurabile sui punteggi TMB al di sopra di circa 10 mutazioni per megabase. Con l'aumento del contenuto di tumore, i punteggi TMB sono rimasti relativamente invariati. Per i campioni MSI-High, il contenuto di tumore ha mostrato una correlazione lineare positiva con il punteggio MSI. I campioni MSI-High rimanevano in media MSI-High quando il contenuto di tumore era ≥30%. I campioni endometriali si sono comportati in modo significativamente diverso rispetto ad altri tipi di tessuto ed hanno messo in evidenza la necessità di un maggiore contenuto di tumore per essere identificati MSI-High.

Accuratezza per il profilo del tumore

Il rilevamento delle varianti con il saggio TSO Comprehensive (UE) è stato confrontato con i risultati ottenuti dai metodi di riferimento. Le varianti piccole di DNA e TMB sono state confrontate con un metodo esterno di NGS dell'intero esoma. Le amplificazioni geniche sono state confrontate con lo stesso metodo NGS dell'intero esoma o convalidate con il metodo della doppia ibridazione in situ (DISH) per le amplificazioni HER2. MSI è stato

valutato rispetto a un test MSI-PCR convalidato. Le varianti di splicing di RNA sono state confrontate rispetto a un metodo di PCR quantitativa (qPCR) convalidato. Le fusioni ROS1 e ALK sono state confrontate rispetto ai saggi FISH convalidati. Tutte le altre fusioni sono state confrontate con un metodo composito che consisteva in un saggio NGS dell'intero esoma di RNA (RNGS1), un pannello NGS mirato (RNGS2) e PCR digitale su goccioline (ddPCR).

Rilevamento di varianti piccole di DNA

Il rilevamento di varianti piccole di DNA con il saggio TSO Comprehensive (UE) è stato confrontato con il sequenziamento dell'intero esoma (WES) che utilizza WES con coppie di campioni corrispondenti di tumore normali per l'identificazione di varianti piccole somatiche e della linea germinale. Il confronto tra le varianti piccole, che consisteva di varianti di singolo nucleotide (SNV), inserzioni e delezioni, si è basato su 124 campioni da 14 diversi tipi di tessuto che erano validi sia per TSO Comprehensive (UE) che per WES. TSO Comprehensive (UE) ma non il saggio WES, può rilevare le varianti multinucleotidiche (MNV, 2-3 bp) che richiedono una determinazione delle fasi. Le varianti MNV di TSO Comprehensive (UE) sono state valutate come singole SNV rispetto a WES. La Tabella 75 mostra un riepilogo della concordanza a livello di variante incluse la percentuale di concordanza positiva (PPA) e la percentuale di concordanza negativa (NPA) per tutte le identificazioni di varianti.

Tabella 75 Riepilogo della concordanza per le identificazioni di varianti piccole valutate per lo stato somatico o della linea germinale

	Identificazione somatica WES	Identificazione WES Germline	Non identificata WES
TSO Comprehensive (UE) identificato	382	33.163	426
TSO Comprehensive (UE) non identificato	69	61	70.000.481
Totale	451	33.224	70.000.907
Percentuale di concordanza	PPA: 85% (382/451), IC al 95%: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33.163/33.224) IC al 95%: [99,8%, 99,9%]	NPA: > 99% (70.000.481/70.000.907) IC al 95%: [99,999%, 99,999%]

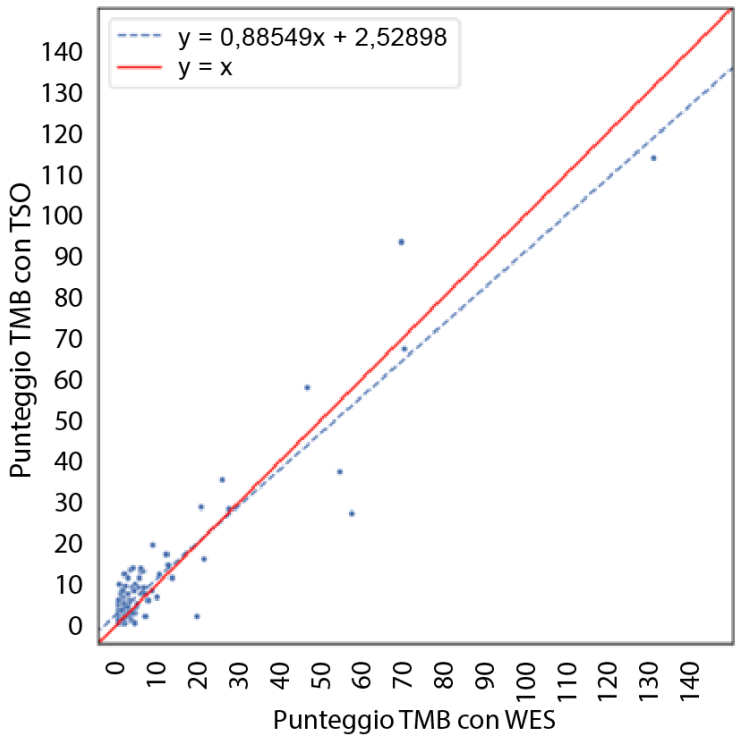
In totale, TSO Comprehensive (UE) ha identificato 426 varianti somatiche non identificate dal metodo WES. Duecentoquattro (48%) di queste varianti avevano una frequenza allelica delle varianti inferiore alla soglia di identificazione nel metodo WES. Delle potenziali varianti falso positive rimanenti, vi era prova dell'identificazione

della variante nel metodo WES con basso supporto. Inoltre, molte delle varianti avevano prove di WES a livello molto basso nei campioni normali corrispondenti. Questo suggerisce che tali varianti non sono state individuate nel tumore con WES a causa della normale contaminazione del tumore.

Rilevamento del carico mutazionale del tumore (TMB)

La concordanza di TMB è stata determinata confrontando i punteggi di TMB (mutazioni somatiche/megabase) tra il metodo WES e TSO Comprehensive (UE) per 124 campioni con dati disponibili sia per TSO Comprehensive (UE) che per WES. L'analisi della regressione lineare con WES come predittore aveva una intercetta y di 2,53, una pendenza di 0,89 e un coefficiente di correlazione Pearson di 0,94 (Figura 3).

Figura 3 Correlazione del punteggio di TMB tra WES e TSO Comprehensive (UE)



Rilevamento delle amplificazioni geniche

Il rilevamento delle amplificazioni geniche con il saggio TSO Comprehensive (UE) è stato confrontato con i risultati dello stesso saggio WES utilizzando campioni che corrispondono a campioni di tumore normale o a campioni di solo tumore. In totale, erano presenti 420 campioni, per 183 dei quali è stato utilizzato il metodo ortogonale tumore/normale e per 237 il metodo solo tumore. Dei 420 campioni, 50 campioni sono stati selezionati per lo studio perché erano positivi all'amplificazione con TSO Comprehensive (UE) o con un test precedente. Le prestazioni per questi campioni caratterizzati sono state aggiustate utilizzando una prevalenza media di fusione. Le prestazioni combinate tra campioni caratterizzati e non caratterizzati hanno utilizzato una media ponderata a variazione inversa. I campioni provenivano da 14 tipi di tessuto e contenevano amplificazioni da 55 geni. TSO Comprehensive (UE) riporta amplificazioni geniche dai geni MET ed ERBB2. Tuttavia, è stata valutata l'accuratezza per tutti i 55 geni. La Tabella 76 mostra un riepilogo delle identificazioni dell'amplificazione genica.

Tabella 76 Sintesi della concordanza per le amplificazioni geniche

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

* Intervallo di confidenza calcolato mediante bootstrap.

Le amplificazioni del gene ERBB2 (HER2) nei tessuti gastrico e mammella sono stati analizzati separatamente da altre amplificazioni geniche utilizzando il metodo della doppia ibridazione in situ (DISH, Dual In-Situ Hybridization). In totale sono stati analizzati 116 campioni di tessuto gastrico e mammella, dei quali 64 erano stati precedentemente caratterizzati come HER2 positivi mediante IHC o FISH. Un campione non ha superato l'estrazione, 4 campioni non hanno superato la validità per TSO Comprehensive (UE) e 3 campioni non hanno superato la validità per il saggio DISH. Dei 108 campioni, 20 (18,5%) hanno ottenuto punteggi borderline (tra 1,5 e 2,5) prossimi al cutoff DISH di 2,0. La Tabella 77 mostra i risultati di concordanza, inclusi PPA e NPA, per tutti i campioni nonché i casi HER2 con DISH.

Tabella 77 Riepilogo della concordanza tra TSO Comprehensive e HER2 con DISH inclusa l'amplificazione genica per HER2

Amplificazione genica HER2 Tutti (mammella e gastrico)	HER2 amplificato con DISH	HER2 non amplificato con DISH
TSO Comprehensive (UE) Positivo	17 (incluso 1 borderline)	13 (incluso 1 borderline)
TSO Comprehensive (UE) Negativo	10 (inclusi 6 borderline)	68 (inclusi 12 borderline)
Percentuale di concordanza positiva inclusi i casi borderline	PPA: 63% (17/27) IC al 95%: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) IC al 95%: [74%, 90%]
Percentuale di concordanza negativa esclusi i casi borderline	PPA: 80% (16/20) IC al 95%: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) IC al 95%: [72%, 90%]

Rilevamento dello stato di instabilità microsatellitare (MSI)

Il rilevamento dell'instabilità microsatellitare con il saggio TSO Comprehensive (UE) è stato confrontato con i risultati di un test MSI-PCR convalidato che utilizza, per l'analisi, campioni che corrispondono al tumore normale. È stato confrontato un totale di 195 campioni, che hanno raggiunto il contenuto di tumore di ≥30% (per lo stato MS-Stable) e che rappresentano 14 tipi di tessuto. MSI-PCR esamina 5 siti e ha 3 esiti: MSI-Stable (nessun sito instabile), MSI-Low (un sito instabile) e MSI-High (due o più siti instabili). TSO Comprehensive (UE) valuta fino a 130 siti microsatellitari e classifica i campioni solo come MS-Stable o MSI-High (siti instabili ≥20%). I valori MSI-Low sono stati raggruppati con gli esiti MS-Stable per MSI-PCR. La Tabella 78 mostra l'analisi della concordanza.

Tabella 78 Riepilogo dell'analisi della concordanza tra TSO Comprehensive (UE) e MSI-PCR per l'instabilità microsatellitare del DNA

Stato MSI	MSI-High PCR	MSI-Low PCR	MSI-Stable PCR
TSO Comprehensive (UE) Instabile (MSI-High)	41	2	0
TSO Comprehensive (UE) Stabile (MS-Stable)	3	0	150
Totale	44	2	150
Percentuale di concordanza	PPA: 93% (41/44) IC al 95%: [82%, 98%]	NPA: 99% (150/152) IC al 95%: [95%, > 99%]	

Rilevamento delle varianti di splicing di RNA

L'accuratezza per il rilevamento delle varianti di splicing è stata calcolata confrontando i risultati di TSO Comprehensive (UE) con i saggi qPCR per EGFRvIII e skipping dell'esone 14 di MET includendo un RNA positivo noto per ognuna delle varianti di splicing. L'analisi della concordanza è stata eseguita su un totale di 230 campioni di RNA in FFPE unici da 14 tipi di tessuto con i dati disponibili da TSO Comprehensive (UE) e dal metodo di riferimento. Tutti i campioni sono stati testati per skipping dell'esone 14 di MET, mentre EGFRvIII è stato testato rispettivamente solo nel tessuto cerebrale. Tre campioni, identificati come positivi per skipping dell'esone 14 di MET da qPCR ma non da TSO Comprehensive (UE), avevano un Ct medio >37 e erano al di sotto del livello LoD di TSO Comprehensive (UE). La Tabella 79 riassume i risultati dello studio di concordanza.

Tabella 79 Riepilogo dell'analisi di concordanza tra TSO Comprehensive (UE) e il saggio qPCR per le varianti di splicing dell'RNA

Varianti di splicing di RNA	qPCR positivo	qPCR negativo
TSO Comprehensive (UE) Positivo (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (UE) Negativo (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (UE) Positivo Skipping dell'esone 14 di MET	1	0
TSO Comprehensive (UE) Negativo Skipping dell'esone 14 di MET	3	217
Totale	7	230
Percentuale di concordanza	PPA: 57% (4/7) IC al 95% : [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) IC al 95% : [98%, 100%]

Rilevamento delle fusioni di RNA

Confronto con un metodo composito

Le fusioni TSO Comprehensive (UE) ottenute sono state confrontate con un metodo composito che consisteva nel sequenziamento dell'esoma intero di un RNA utilizzando un pannello NGS (RNGS1), un pannello di fusioni NGS mirato (RNGS2) e PCR digitale su goccioline (ddPCR).

Il metodo RNGS1 si sovrappone con tutti i geni per i quali TSO Comprehensive (UE) rileva le fusioni. Tuttavia, il limite di rilevamento del metodo RNGS1 era 4X-8X rispetto a TSO Comprehensive (UE), che si basava su un numero di letture di supporto osservate nelle identificazioni delle fusioni che si sovrapponevano. Pertanto, con il metodo WES (RNGS1), è stato utilizzato un metodo composito che include due metodi aggiuntivi con maggiore sensibilità ma minore gamma di fusioni.

Sono stati analizzati 255 campioni unici di RNA che rappresentavano 14 tipi di tessuto e che avevano superato le metriche di TSO Comprehensive (UE) con il metodo RNGS1. Non sono stati ulteriormente analizzati due campioni risultati non validi per il controllo qualità del campione con RNGS1. Delle 82 fusioni identificate da TSO Comprehensive (UE), 4 sono state escluse dalla valutazione perché i controlli qualità del campione con RNGS1 non sono riusciti; non è stato possibile identificare 7 ulteriori fusioni per la mancanza di target nel pannello RNGS1. Delle 71 fusioni restanti e identificate da TSO Comprehensive (UE), 9 sono state confermate da RNGS1. RNGS1 ha identificato 4 fusioni non identificate da TSO Comprehensive (UE).

Delle 62 fusioni positive con TSO Comprehensive (UE) e non rilevate da RNGS1, 13 si sovrapponevano e sono state confermate da RNGS2. Una fusione è stata identificata da RNGS2 ma non da TSO Comprehensive (UE).

La PCR digitale su goccioline è stata quindi utilizzata per le fusioni identificate da TSO Comprehensive (UE), per le fusioni non identificate o non identificabili da RNGS1 e non valutabili da RNGS2 (49). Inoltre, la ddPCR è stata utilizzata per la rivalutazione di 2 delle 4 fusioni false negative per TSO Comprehensive (UE) con RNGS1 e 2 delle 9 fusioni concordanti per TSO Comprehensive (UE) e RNGS1. Per assicurare la specificità, cinque campioni con fusioni negative sono stati inclusi nell'analisi di ogni campione con fusioni positive. Diciotto fusioni non sono state analizzate con la ddPCR perché era impossibile progettare primer/sonde, più geni partner per la fusione o era insufficiente il materiale in FFPE rimasto. Per la ddPCR, i primer e le sonde sono stati progettati sui breakpoint osservati nel saggio TSO Comprehensive (UE).

In totale sono state identificate 52 fusioni mediante la ddPCR, 41 delle quali sono state identificate da TSO Comprehensive (UE) ma non identificate o non identificabili da RNGS1. Nove fusioni sono state identificate dalla ddPCR ma sono risultate negative in TSO Comprehensive (UE) o RNGS1. Due fusioni positive identificate dalla ddPCR hanno confermato le 2 fusioni concordanti per TSO Comprehensive (UE) e RNGS1. Nessuna fusione è stata rilevata dalla ddPCR per i 2 falsi negativi TSO Comprehensive (UE) rivalutati con RNGS1; tuttavia, queste due fusioni sono state conteggiate come falsi negativi in base al confronto con RNGS1.

Dei 255 campioni, 35 campioni sono stati selezionati per lo studio perché erano positivi alla fusione con TSO Comprehensive (UE) o con un saggio precedente. Le prestazioni per questi campioni caratterizzati sono state aggiustate utilizzando una prevalenza media di fusione. Le prestazioni combinate tra campioni caratterizzati e non caratterizzati hanno utilizzato una media ponderata a variazione inversa. I risultati di concordanza compositi per le fusioni sono illustrati nella Tabella 80.

Le 66 fusioni (54 fusioni uniche) concordanti con il metodo compositivo rappresentavano 43 geni nel pannello TSO Comprehensive (UE). Tuttavia, le fusioni possono essere riportate solo dai 23 geni indicati nella Tabella 80.

Tabella 80 Riepilogo della concordanza per le fusioni di RNA

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

* Intervallo di confidenza calcolato mediante bootstrap.

Confronto rispetto al metodo FISH per le fusioni ROS1 e ALK

Venticinque campioni NSCLC sono stati analizzati con il metodo FISH per entrambe le fusioni ROS1 e ALK e 5 ulteriori campioni NSCLC sono stati analizzati per le fusioni ROS1, rispettivamente. Otto campioni sono falliti con il metodo FISH per ROS1 a causa di tessuto non adeguato. Due fusioni ROS1 e una fusione ALK sono state rilevate sia da TSO Comprehensive (UE) che dal metodo FISH. Non sono stati osservati risultati discordanti. La Tabella 81 riassume i risultati di concordanza di TSO Comprehensive (UE) e il metodo FISH per le fusioni ROS1 e ALK.

Tabella 81 Riepilogo dei risultati di conformità di TSO Comprehensive (UE) e metodo FISH per fusioni ROS1 e ALK

ALK+ROS1	FISH positivo	FISH negativo
TSO Comprehensive (UE) Positivo	3	0
TSO Comprehensive (UE) Negativo	0	44
Totale	3	44
Percentuale di concordanza	PPA: 100% (3/3) IC al 95%: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) IC al 95%: [92%, 100%]

Validità del campione

La validità del campione (primo tentativo) è stata misurata per 181 campioni di RNA unici e 272 campioni di DNA unici da blocchetti di tessuto in FFPE di ≤ 5 anni di età. Questi campioni sono stati selezionati in base al tipo di tessuto e al materiale disponibile; la validità del saggio non era nota. Per essere considerato valido, il tipo di variante deve superare le metriche di controllo qualità delle librerie. La validità del campione valutata separatamente per ogni tipo di variante (varianti piccole di DNA/TMB, MSI, amplificazioni geniche, fusioni/varianti di splicing) è mostrata nella Tabella 82. È prevista un'ulteriore riduzione della validità di MSI dell'1% per i blocchetti FFPE di età ≤2 anni a causa della spedizione dei reagenti.

Tabella 82 Validità del campione

Tipo di variante	Validità del campione
Fusioni/varianti di splicing (RNA)	76%
Varianti piccole di DNA/TMB	75%
MSI	72%
Amplificazione genica	94%

Riepilogo della validazione analitica per Tumor Profiling Claims

In base ai dati relativi al limite di rilevamento, alla precisione, alla riproducibilità e all'accuratezza, TSO Comprehensive (UE) è convalidato dal punto di vista analitico per quanto segue:

- Varianti piccole di DNA: SNV, MNV, inserzioni e delezioni.
- TMB
- MSI
- Amplificazioni geniche di MET e ERBB2 (HER2) (consultare la Tabella 2).
- 23 geni per i quali possono essere rilevate le fusioni (consultare la Tabella 2).
- Varianti di splicing di EGFR e MET (consultare la Tabella 2).

Prestazioni cliniche di NTRK

Per convalidare il saggio TSO Comprehensive (UE) come diagnostica di accompagnamento (CDx) per la selezione di pazienti per il trattamento con VITRAKVI (larotrectinib), sono stati analizzati i campioni di pazienti arruolati nei trial clinici su larotrectinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; collettivamente chiamati campioni del trial su larotrectinib) utilizzando la data di cutoff del 15 luglio 2019 e con l'aggiunta di campioni di tessuti in FFPE disponibili in commercio, per supportare uno studio di accuratezza e uno studio clinico bridging per il saggio TSO Comprehensive (UE).

NCT02122913 era uno studio di fase 1, multicentrico, open-label, con incremento progressivo della dose in pazienti adulti con tumori solidi avanzati (all comers) non selezionati per il tumore positivo alla fusione di NTRK. A seguito della fase dello studio con incremento progressivo della dose, è stata avviata una espansione della dose per i pazienti con tumore positivo alla fusione di NTRK e per i pazienti che lo sperimentatore riteneva potessero beneficiare da un inibitore TRK altamente selettivo. NAVIGATE NCT02576431 è uno studio basket di fase 2, in corso, multicentrico, open label in pazienti di età pari o superiore a 12 anni affetti da tumori solidi avanzati e ricorrenti con fusione di NTRK documentata da un laboratorio esterno. SCOUT NCT02637687 studio di fase 1/2, in corso, multicentrico, open label in pazienti pediatrici di età compresa tra la nascita e 21 anni affetti da tumori solidi o primari del sistema nervoso centrale primario (SNC) avanzati.

Dei pazienti positivi alla fusione di NTRK inclusi nello studio del saggio TSO Comprehensive (UE), 164 hanno formato il gruppo di efficacia primaria estesa di larotrectinib (ePAS4).

Studio di accuratezza per il rilevamento delle fusioni di NTRK1, NTRK2, NTRK3

L'accuratezza del saggio TSO Comprehensive (UE) per il rilevamento delle fusioni di NTRK (NTRK1, NTRK2, or NTRK3) in pazienti affetti da tumori solidi è stata dimostrata valutando la concordanza dei risultati relativi alle fusioni di NTRK ottenuti dal saggio TSO Comprehensive (UE) e da un metodo ortogonale convalidato basato sull'NGS.

È stato condotto uno studio retrospettivo non interventistico. I campioni del trial su larotrectinib e ulteriori campioni sono stati analizzati con il saggio TSO Comprehensive (UE) presso una sede esterna e con un metodo ortogonale presso un laboratorio centrale. L'accuratezza del saggio TSO Comprehensive (UE) nell'identificazione delle fusioni di NTRK è stata stimata rispetto a un metodo ortogonale; sono stati calcolati la percentuale di concordanza positiva (PPA), la percentuale di concordanza negativa (NPA) e gli intervalli di confidenza (IC) bilaterale al 95% associati.

Sono stati analizzati 516 campioni con il saggio TSO Comprehensive (UE) e/o il metodo ortogonale. Di questi campioni, 499 sono stati analizzati con entrambi i metodi. Diciassette dei 516 campioni non sono stati analizzati con uno dei saggi per mancata estrazione, motivo sconosciuto (per il metodo ortogonale) o deviazione dal protocollo. Dei 499 campioni analizzati da entrambi i metodi, 170 (34,1%) erano campioni del trial su larotrectinib e 329 (65,9%) erano campioni aggiuntivi.

Una tabulazione incrociata dei risultati per i 499 campioni è mostrata nella Tabella 83. Dei 499 campioni, 85 avevano risultati del saggio TSO Comprehensive (UE) non validi; di questi 85, anche 53 avevano risultati del metodo ortogonale non validi. Ulteriori sette campioni presentavano risultati non validi per il metodo ortogonale. Quindi, 407 dei 499 campioni presentavano risultati validi per entrambi i metodi.

Tabella 83 NTRK- Studio di accuratezza: tabulazione incrociata del risultato di TSO Comprehensive (UE) rispetto al risultato del metodo ortogonale per il rilevamento di fusioni di NTRK

	Risultato del metodo ortogonale			
Risultato del saggio TSO Comprehensive (UE)	**Fusione di NTRK positiva**	**Fusione di NTRK negativa**	**Non valido**	**Totale**
Fusione di NTRK positiva	114	16	1	131
Fusione di NTRK negativa	4	273	6	283
Non validi*	4	28	53	85
Totale	122	317	60	499

* I risultati non validi del saggio TSO Comprehensive (UE) sono stati ottenuti a livello di campione e di corsa.

Le analisi della concordanza, esclusi e inclusi i risultati non validi del saggio TSO Comprehensive (UE), sono mostrate nella Tabella 84. Esclusi i risultati non validi del saggio TSO Comprehensive (UE), la PPA era del 96,6% (114/118; IC al 95%: 91,5%-99,1%) e la NPA era del 94,5% (273/289; IC al 95%: 91,2%-96,8%).

Tabella 84 NTRK- Studio di accuratezza: PPA e NPA del saggio TSO Comprehensive (UE) rispetto al risultato del metodo ortogonale nell'identificazione di fusioni di NTRK

	Esclusi i risultati non validi del saggio TSO Comprehensive (UE)		Inclusi i risultati non validi del saggio TSO Comprehensive (UE)	
Misura della concordanza	**Concordanza, % (n/N)**	**IC al 95%***	**Concordanza, % (n/N)**	**IC al 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 al 95% in base al metodo (esatto) di Clopper-Pearson.

Studio clinico bridging per il rilevamento delle fusioni di NTRK1, NTRK2, NTRK3

La validità clinica del saggio TSO Comprehensive (UE) nel rilevamento delle fusioni di NTRK1, NTRK2 o NTRK3 in pazienti affetti da tumori solidi che potrebbero trarre benefici dal trattamento con larotrectinib è stata dimostrata in uno studio clinico bridging. Lo studio è stato condotto per valutare l'efficacia clinica del saggio TSO Comprehensive (UE) nell'identificazione di pazienti con fusioni di NTRK1, NTRK2 o NTRK3 positive adatti al trattamento con larotrectinib e per valutare la concordanza tra il saggio TSO Comprehensive (UE) e i metodi di analisi locali (LT) (utilizzati per determinare lo stato delle fusioni di NTRK per i trial clinici su larotrectinib).

I metodi LT includevano saggi per NGS, ibridazione fluorescente in situ (FISH), reazione di polimerizzazione a catena (PCR) e NanoString. Le fusioni di NTRK (ETV6 NTRK3) sono state dedotte per i pazienti affetti da fibrosarcoma infantile e che avevano una traslocazione documentata di ETV6 identificata mediante FISH. La maggior parte dei 235 pazienti del trial su larotrectinib con stato della fusione di NTRK nota sono stati analizzati con i metodi NGS.

Alla data di cutoff dei dati del 15 luglio 2019, erano stati arruolati 279 pazienti. Dei 279 pazienti, 208 erano positivi alla fusione di NTRK. Dei 208 pazienti positivi, 164 hanno formato la popolazione ePAS4 per larotrectinib.

L'endpoint primario per l'analisi di efficacia di larotrectinib era il tasso di risposta complessivo (ORR) in base alla valutazione del comitato di revisione indipendente (IRC) su una serie di dati raggruppati ottenuti dai tre studi clinici. ORR è stato valutato in base alla percentuale di pazienti con la migliore risposta complessiva di risposta completa confermata o risposta parziale confermata in base ai criteri RECIST, versione 1.1. ORR nella popolazione ePAS4 di larotrectinib era del 72,6%, (IC al 95% [65,1%, 79,2%]) e includeva pazienti affetti da 16 diversi tipi di tumore.

Tipi di campione utilizzati

Il gruppo di campioni includeva un'ampia gamma di tipi di tumore e campioni di pazienti pediatrici e adulti.

Al 15 luglio 2019 sono stati arruolati 279 pazienti negli studi su larotrectinib. Di questi, 235 pazienti presentavano lo stato della fusione di NTRK noto come determinato dal metodo LT: 208 erano positivi e 27 erano negativi. Per 44 pazienti lo stato della fusione di NTRK era sconosciuto, in quanto non ne era richiesta l'analisi per l'idoneità dei pazienti alle fasi di incremento progressivo della dose degli studi NCT02122913 e

SCOUT NCT02637687. Per lo studio clinico bridging del saggio TSO Comprehensive (UE) erano idonei i campioni di pazienti del trial su larotrectinib arruolati al 15 luglio 2019 con stato della fusione di NTRK noto (208 pazienti positivi e 27 pazienti negativi) e ulteriori campioni per i quali è stata determinata la fusione di NTRK negativa mediante metodi LT rappresentativi.

Dei 208 campioni positivi del trial su larotrectinib, 154 erano disponibili per l'analisi con il saggio TSO Comprehensive (UE). Di questi, 138 sono risultati validi. Quindici campioni non erano validi poiché non avevano superato le metriche di qualità del sequenziamento del campione e un campione non era stato analizzato a causa di una deviazione dal protocollo. Dei 27 campioni negativi del trial su larotrectinib, 24 erano disponibili per l'analisi. Di questi, 22 avevano risultati validi al saggio TSO Comprehensive (UE). Due campioni non erano validi poiché non avevano superato le metriche di qualità del sequenziamento del campione.

I campioni aggiuntivi sono stati sottoposti a screening utilizzando uno dei due metodi LT rappresentativi. Sono stati ottenuti più di 350 campioni per esaminarne il contenuto tumorale. Dei campioni aggiuntivi che hanno soddisfatto i requisiti del campione, 266 sono stati correttamente estratti e confermati negativi alla fusione di NTRK mediante un metodo LT rappresentativo. Di questi campioni, 260 erano disponibili per l'analisi con il saggio TSO Comprehensive (UE) e 222 presentavano risultati validi. 38 campioni non erano validi perché non avevano superato le metriche del sequenziamento per il campione (n = 25) o non avevano superato il sequenziamento della corsa (n = 13). Il gruppo totale di fusioni di NTRK negative comprendeva 222 campioni aggiuntivi e 22 campioni dal trial su larotrectinib.

Risultati di concordanza

Complessivamente, sono stati analizzati 437 campioni da TSO Comprehensive (UE). Tra i 208 pazienti positivi alla fusione NTRK, 153 avevano campioni disponibili e sono stati testati da TSO Comprehensive (UE), ottenendo 138 risultati validi e 15 risultati non validi.

La Tabella 85 mostra la concordanza dei risultati ottenuti da TSO Comprehensive (UE) rispetto ai risultati ottenuti dai metodi LT, con o senza risultati TSO Comprehensive (UE) non validi.

Tabella 85 NTRK- Studio clinico bridging: Concordanza tra il saggio TSO Comprehensive (UE) e i metodi LT per il rilevamento delle fusioni NTRK

	Esclusi i risultati non validi del saggio TSO Comprehensive (UE)		Inclusi i risultati non validi del saggio TSO Comprehensive (UE)	
Misura della concordanza	**% concordanza (n/N)**	**IC al 95%***	**% concordanza (n/N)**	**IC al 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

* L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è stato calcolato utilizzando il metodo (esatto) di Clopper-Pearson.

L'analisi di sensibilità rispetto ai risultati mancanti del saggio TSO Comprehensive (UE) dimostrano l'efficacia dell'analisi di concordanza. I risultati mancanti del saggio TSO Comprehensive (UE) per i pazienti positivi alla fusione di NTRK con il metodo LT (n=70) sono stati imputati utilizzando un modello di regressione logistica. La Tabella 86 mostra le stime di concordanza, inclusi i valori imputati.

Tabella 86 NTRK- Studio clinico bridging: Concordanza tra il saggio TSO Comprehensive (UE) e i metodi LT per il rilevamento delle fusioni di NTRK inclusi i valori imputati per i pazienti positivi con LT con risultati mancanti del saggio TSO Comprehensive (UE)

Misura della concordanza	% di concordanza	IC al 95%*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

I risultati mancanti del saggio TSO Comprehensive (EU) per i pazienti negativi alla fusione con LT non sono stati imputati.
* L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è stato calcolato in base al metodo Boot di imputazione dei multipli. Il metodo Boot di imputazione dei multipli è una fase bootstrap nell'imputazione dei multipli (Schomaker e Heumann 2018).

La Tabella 87 mostra le concordanze tra il saggio TSO Comprehensive (UE) e i metodi LT per tipo di metodo (ad esempio, RNA NGS, FISH).

Tabella 87 NTRK- Studio clinico bridging: Concordanza tra il saggio TSO Comprehensive (UE) e i metodi LT per il rilevamento delle fusioni di NTRK per tipo di metodo LT

Tipo di metodo LT	Misura della concordanza	% concordanza (n/N)	IC al 95%[1]
NGS DNA	PPA	84,2 (32/38)	(68,7, 94,0)
	NPA	88,9 (16/18)	(65,3, 98,6)
	OPA	85,7 (48/56)	(73,8, 93,6)
RNA NGS[2]	PPA	91,5 (75/82)	(83,2, 96,5)
	NPA	96,9 (218/225)	(93,7, 98,7)
	OPA	95,4 (293/307)	(92,5, 97,5)
FISH	PPA	80,0 (8/10)	(44,4, 97,5)
	NPA	Non calcolato (1/1)	Non calcolato
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Non calcolato (0/0)	Non calcolato
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Non calcolato: per i sottogruppi con un conteggio di campione < 5, non sono state calcolate le statistiche di concordanza.
[1] L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è stato calcolato utilizzando il metodo (esatto) di Clopper-Pearson.
[2] Include i metodi NGS che utilizzano solo RNA o sia DNA che RNA.

Dei 437 campioni analizzati con il saggio TSO Comprehensive (UE), 24 presentavano risultati discordanti con i metodi LT: 15 erano positivi con i metodi LT e negativi con il saggio TSO Comprehensive (UE) e 9 erano negativi con i metodi LT e positivi con il saggio TSO Comprehensive (UE). Dei 24 campioni con risultati discordanti, 8 sono stati analizzati con un metodo LT NGS DNA, 14 con un metodo LT NGS RNA e 2 con FISH.

Un metodo NGS convalidato e indipendente ha confermato i risultati del saggio TSO Comprehensive (UE) in 14 dei 24 campioni con risultati discordanti. Per i restanti 10 campioni, i risultati del saggio TSO Comprehensive (UE) erano discordanti sia con il metodo LT che con il metodo NGS indipendente.

Risultati di efficacia clinica

Nella coorte ePAS4, l'efficacia di larotrectinib in TSO Comprehensive (UE) positivo e nella popolazione LT positiva (97 pazienti, ORR=78,4%, IC al 95% [68,8%, 86,1%]) era simile all'efficacia di larotrectinib nella popolazione ePAS4 totale (164 pazienti, ORR=72,6%, IC al 95% [65,1%, 79,2%]) (Tabella 88). Dei 97 pazienti positivi con TSO Comprehensive (UE) nella popolazione ePAS4, 28 (28,9%) pazienti hanno ottenuto una risposta completa/risposta chirurgica completa e 48 (49,5%) pazienti hanno ottenuto una risposta parziale.

Dei 13 TSO Comprehensive (UE) negativi, la popolazione LT positivi, 1 (7,7%) ha mostrato una risposta completa e 2 (15,4%) hanno mostrato una risposta parziale alla terapia con larotrectinib.

Tabella 88 NTRK- Studio clinico bridging: ORR per i pazienti LT positivi per i risultati LT e TSO Comprehensive (UE) in ePAS4

		Fusioni LT positive N=164	TSO Comprehensive (UE) Positive e LT Positive N=97	TSO Comprehensive (UE) Negative e LT Positive N=13
Risposta complessiva migliore, n (%)	Risposta completa	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Risposta chirurgica completa	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Risposta parziale	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Patologia stabile	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Patologia progressiva	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Non valutabile	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Tasso di risposta complessiva	Numero di pazienti, n	164	97	13
	Numero di pazienti con CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (IC al 95%*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Abbreviazioni: CR = risposta completa, PR = risposta parziale , sCR = risposta chirurgica completa.
* L'intervallo di confidenza bilaterale al 95% è stato calcolato utilizzando il metodo (esatto) di Clopper-Pearson.
Per 54 pazienti mancavano i risultati del saggio TSO Comprehensive (EU).

I dati ottenuti da questo studio supportano la sicurezza e l'efficacia del saggio TSO Comprehensive (UE) quando utilizzato nell'identificazione di pazienti con tumori solidi e con fusioni di NTRK che potrebbero essere idonei per il trattamento con larotrectinib.

Bibliografia

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Consultato il 3 ottobre 2016.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Consultato il 3 ottobre 2016.

Cronologia revisioni

Revisione	Data	Descrizione della modifica
Documento n 200007789 v08	Maggio 2025	Rimosso il riferimento alle versioni del software e ai codici prodotto. Aggiornati i limiti della procedura: • Informazioni sul tessuto necrotico. • Informazioni sul contenuto tumorale MSI. Aggiornati: • Nota a piè di pagina NTC da applicare sia alle librerie min che a quelle max. • Elenco delle attrezzature e dei materiali, specifiche della centrifuga per piastre e incrementi delle pipette. • Calcolo dell'eccesso di SPB da 1,05x a 1,15x. • Terminologia per Met Exon 14del a skipping dell'esone 14 di MET. Aggiunte: • Nota per SMB in Target di cattura Uno e Due. • Preparazione all'introduzione del sequenziamento. • Ulteriori informazioni sul sonificatore a ultrasuoni. Aggiunti chiarimenti e risultati aggiornati per le caratteristiche prestazionali: • Sostanze interferenti. • Accuratezza per la profilazione del tumore e la validità del campione. • Studio 1 e 2 sul limite di rilevamento. • Studio 1 di precisione all'interno del laboratorio. • Studio 2 di riproducibilità. • Stabilità della libreria e informazioni sulla conservazione della libreria. • Limite del bianco. Linguaggio e grammatica aggiornati.

Revisione	Data	Descrizione della modifica

Documento n. 200007789 v07	Gennaio 2024	• Aggiunta di informazioni alle limitazioni della procedura:
		  • Requisiti del campione di tessuto necrotico e del contenuto tumorale per mutazioni somatiche driver e MSI-alto.
		  • Potenziale interferenza da emoglobina.
		  • Limiti di rilevamento nel gene RET e fusione al di fuori dei limiti del gene annotato.
		  • Le delezioni geniche non sono riportate.
		• Aggiornato per l'uso con il software TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager versione 2.3.7.
		• Aggiunte informazioni alle apparecchiature e ai materiali richiesti ma non forniti, incluse due configurazioni aggiuntive del sonificatore a ultrasuoni.
		• Aggiornamento delle informazioni su campioni ed esemplari:
		  • Contenuto di tessuto necrotico.
		  • Effetti della proteinasi K e dell'emoglobina.
		  • Conservazione di FFPE montato su vetrino e acido nucleico purificato.
		• Aggiunte informazioni per migliorare la gestione dei reagenti, il flusso di lavoro e la risoluzione dei problemi relativi ai guasti del controllo qualità della sessione.
		• Aggiunta di contesto e chiarezza alle Caratteristiche delle prestazioni:
		  • Contaminazione incrociata
		  • Valutazione di Nucleic Acid Extraction Kit
		  • Sostanze interferenti
		  • Stabilità dell'acido nucleico e dell'FFPE montato su vetrino
		  • Prestazioni cliniche di NTRK
		• Lingua e grammatica aggiornate

Documento n. 200007789 v06	Febbraio 2023	• Ulteriori dichiarazioni nella sezione Limitazioni • Aggiornamenti linguistici per convenzioni, ortografia e chiarezza • Correzione delle tabelle 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Dichiarazione sulla presenza di precipitati nel reagente FSM • Aggiornamento delle specifiche del termociclatore e del serbatoio nell'elenco delle attrezzature e dei materiali.
Documento n 200007789 v05	Settembre 2022	Aggiornamento delle tabelle di riproducibilità dello studio 2

Revisione	Data	Descrizione della modifica
Documento n 200007789 v04	Giugno 2022	• Aggiunti i n. codice del modulo di analisi TSO Comprehensive v2.3.5 • Rimossi i n. codice del modulo di analisi TSO Comprehensive v2.3.3 • Aggiornamento della terminologia nella sezione Limite del bianco
Documento n. 200007789 v03	Aprile 2022	• Aggiunte le informazioni sulle caratteristiche delle prestazioni relative alle fusioni di NTRK • Aggiunta la marcatura SOLO PER ESPORTAZIONE • Aggiornata la dichiarazione di uso previsto per aggiungere la dichiarazione per NTRK1-3 con CDx • Ampliate le informazioni sui componenti del prodotto per includere i numeri di codice dei componenti software
Documento n. 200007789 v02	Febbraio 2022	• Corretto l'errore del riferimento della tabella • Aggiunta la limitazione relativa alle varianti della linea germinale e somatiche • Chiarito il rilevamento delle amplificazioni geniche
Documento n. 200007789 v01	Dicembre 2021	• Aggiornati i limiti della procedura • Chiarite le specifiche del supporto magnetico e del ciclatore termico nell'elenco delle apparecchiature e dei materiali
Documento n. 200007789 v00	Novembre 2021	Versione iniziale

Brevetti e marchi di fabbrica

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti similari di alcun genere.

Al fine di garantire un uso sicuro e corretto dei prodotti ivi descritti, le istruzioni riportate nel presente documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo l'intero contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

© 2025 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, consultare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.

Informazioni di contatto

Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

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

Etichettatura del prodotto

Per un riferimento completo dei simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura, consultare la legenda dei simboli alla pagina Web support.illumina.com sulla scheda *Documentation* (Documentazione) per il kit in uso.