

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

Приложено упатство

ЗА ИН ВИТРО ДИЈАГНОСТИЧКА УПОТРЕБА. САМО ЗА ИЗВОЗ.

Предвидена употреба

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) е дијагностички *in vitro* тест кој користи целно секвенционирање од следната генерација за детекција на варијанти во 517 гени со помош на нуклеински киселини кои се екстрахирани од примероци ткиво од тумор фиксирано со формалин и всадено во парафин (FFPE) од пациенти со канцер со цврсти малигни неоплазми, со инструментот Illumina® NextSeq™ 550Dx. Со тестот може да се детектираат варијанти со еден нуклеотид, варијанти со повеќе нуклеотиди, инсерции, делеции и амплификација на гени од ДНК, и фузии на гени и сплајс варијанти на РНК. Со тестот, исто така, се пријавуваат оцената за мутациското оптоварување со тумор (TMB), и статусот на микросателитската нестабилност (MSI).

Тестот е предвиден да биде придружна дијагностика при идентификацијата на пациентите со рак кои би се лекувале со целната терапија наведена во [Табела 1](#), а во согласност со одобрената ознака за терапевтски производ. Покрај тоа, со тестот е предвидено да се добијат информации за профилирање тумор, кои би ги користеле квалификувани здравствени лица во согласност со професионалните насоки, а не се конечни или препишани за означената употреба на кој било терапевтски производ.

Табела 1 Индикација за придружната дијагностика

Тип тумор	Биомаркери	Целна терапија
Цврсти тумори	Фузии на гени NTRK1, NTRK2 и NTRK3	VITRAKVI® (ларотректиниб)

Резиме и објаснување на анализата

Клинички опис

Ракот е главна причина за смрт во ширум светот и има потенција да потекнува од секое ткиво.^{1, 2} Анализата на генетската основа на ракот е важна за да се идентификуваат пациентите кои би имале корист од таргетираните терапии, како и за да се развијат нови методи за третман. Бројни гени се вклучени во причината или прогресијата на ракот, а многу типови рак носат различни варијанти што влијаат врз тие гени и нивните функции. Тие варијанти може да вклучуваат мутации на гените, како што се варијантите со еден нуклеотид (SNV), варијантите со повеќе нуклеотиди (MNV), инсерции или делеции, амплификации на гените, фузии на гените и преспоени (сплајс) варијанти. Друга последица од

мутациите на гените на ракот е појавата на неоантигени коишто предизвикуваат имунолошки одговори што се специфични за ракот. Мутациската состојба на ракот може да се претстави со TMB и MSI—тоа се геномски потписи кои се однесуваат на појавата на неоантигените на ракот.

TruSight Oncology Comprehensive е квалитативен тест за геномско профилирање (CGP) со помош на секвенционирање од следната генерација (NGS) со кој може да се направи опсежна проценка на геномските варијанти во голем панел на гени кои се поврзани со ракот, наведени во [Табела 2](#). Со анализата може да се детектираат мали варијанти кај 517 гени, плус амплификации на гените, фузии на гените и сплајс варијанти, како што е наведено во [Табела 2](#). Со анализата се покриени секвенците за кодирање на сите гени, освен на TERT, за кој е опфатена само регијата на промотерот, и се проценуваат резултатот за TMB и статусот на MSI. Тие цели за анализа вклучуваат содржини цитирани од професионални организации и други значајни американски упатства. Публикациите на независни конзорциуми и фармацевтските истражувања во доцната фаза, исто така, имаат влијание врз дизајнот на анализата TSO Comprehensive.

Листата со регии што се изземени од одредувањето варијанти може да ја најдете во *TruSight Oncology Comprehensive* Онколошката сеопфатна блок-листа *TruSight* (документ бр. 200009524) достапна на Illumina [веб-локацијата за поддршка](#).

Во [Табела 2](#) идентификувани се следните категории на типовите варијанти:

амплификација на гени (A), фузија (F) и сплајс варијанта (Sp). Во варијантите со мала ДНК спаѓаат SNV, MNV, како и инсерции и делеции.

Табела 2 TSO Comprehensive (EU) Панел за генски анализи

Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта
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	PK1	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

Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта
(18)	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
(19)	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
(21)	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
(23)	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
(25)	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
(26)	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
(27)	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
(29)	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
(31)	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
(37)	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
(39)	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
(40)	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
(41)	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
(42)	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
(49)	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTB	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
(56)	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S

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

Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S

Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
(146 %)	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
(151 %)	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTGN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	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	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П

Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта	Бр.	Entrez ID	Ген	Тип варијанта
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П

Начела на процедурата

Анализата TSO Comprehensive (EU) е дистрибуирано испитување кое се врши мануелно со помош на екстрахирана нуклеинска киселина како влезен материјал. За подготовка на библиотечниот материјал се користи ДНК и/или РНК екстрахирани од ткиво фиксирано со формалин и обложено со парафин (FFPE), кои потоа се збогатуваат за гените поврзани со канцер- и се секвенционираат на инструментот Инструмент NextSeq 550Dx.

Анализата TSO Comprehensive (EU) ги вклучува следните процеси.

- Подготовка и збогатување библиотечен материјал**—за РНК се конвертираат вкупно 40 ng во двоверижна комплементарна ДНК (cDNA). За геномска ДНК (gDNA), 40 ng gDNA се крати на мали фрагменти. Универзалните адаптери за секвенционирање се лигираат на фрагментите од cDNA и gDNA. Адаптерните секвенци P5 и P7 се инкорпорираат во секој библиотечен материјал за да може да се снимат фрагменти библиотечен материјал на површината од проточната ќелија за време на секвенционирањето. Адаптерите ги вклучуваат индексните секвенци i5 и i7 со кои се идентификува секој поединечен примерок и ако станува збор за библиотечен материјал од примероци gDNA, се идентификуваат поединечни молекули со помош на Единствени молекуларни идентификатори (Unique Molecular Identifiers (UMI)). Потоа библиотечниот материјал се збогатува за гените кои се предмет на интерес, со помош на методот заснимање. Во библиотечниот материјал се хибридизираат биотиниларни секвенци на сондата, кои ги опфаќаат региите на гените кои се предмет на интерес и цел на анализата. Сондите и хибридизираните библиотечни материјали кои се цел на анализата, се изолираат од библиотечните материјали кои не се цел на анализата по пат на снимање со стрептавидински магнетни честички. Збогатените библиотечни материјали кои се цел на анализата, се испираат и амплифицираат. Потоа количината на секој збогатен библиотечен материјал се нормализира со помош на методот со топчиња, за да се загарантира подеднаква репрезентација во збирните библиотечни материјали за секвенционирање.
- Секвенционирање и примарна анализа**—Нормализираните и збогатените библиотечни материјали се групираат и се подредуваат во кластери врз проточната ќелија, а потоа се секвенционираат по пат на хемиска синтеза (SBS) на NextSeq 550Dx. За SBS се користи методот на реверзибилен терминатор за да се детектираат единечни флуоресцентно означени деоксинуклеотидни трифосфатни (dNTP) бази додека се инкорпорираат во растечките нишки ДНК. При секој циклус на секвенционирање, во синцирот на нуклеинската киселина се додава единечна dNTP. Ознаката dNTP служи како терминатор за полимеризација. По секое инкорпорирање на dNTP, се снима флуоресцентната боја за да се идентификува базата, а потоа се расцепува за да може да се инкорпорира следниот нуклеотид. Четири dNTP врзани за реверзибилен терминатор (A, G, T, и C) се претставени како единечни, засебни молекули. Како резултат на тоа, со природната конкуренција се

сведува на минимум пристрасноста при инкорпорацијата. За време на примарната анализа, одредувањето бази се врши директно од мерките за интензитет на сигнал при секој циклус на секвенционирање, што доведува до секвенционирање на база-по-база. При секое одредување бази се доделува оценка за квалитет.

- **Секундарна анализа**—Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module се наоѓа на инструментот NextSeq 550Dx како дел од софтверот Local Run Manager за да се олесни TSO Comprehensive (EU) поставувањето на обработката со и да се изврши секундарната анализа на резултатите од секвенционирањето. Секундарната анализа вклучува валидација на обработката и контрола на квалитетот, по што следи демултиплексирање, генерирање FASTQ-датотеки, порамнување и одредување варијанти. Со демултиплексирање се одвојуваат податоците од збирниот библиотечен материјал врз основа на единствените секвенци на индекси кои биле додадени за време на подготовката на библиотечниот материјал. Се генерираат посредни датотеки FASTQ, кои содржат отчитувања на секвенционирањето за секој примерок, како и оценки за квалитетот, изземајќи ги отчитувањата за сите кластери кои не го поминале филтерот. Отчитувањата од секвенционирањето се порамнуваат во однос на референтниот геном за да се идентификува односот помеѓу секвенците и им се припишува оценка врз основа на региите на сличност. Порамнетите отчитувања се впишуваат во датотеки во BAM формат. Софтверот за анализа користи засебни алгоритми за библиотечниот материјал генериран од примероци ДНК и/или РНК за одредување мали варијанти ДНК, амплификации на гени, TMB и MSI за примероците ДНК, како и фузиите и сплајс варијантите на примероците РНК. Софтверскиот модул за анализа генерира повеќе излезни податоци, меѓу кои и мерни показатели за секвенционирање и датотеки за Формат за одредување варијанти (VCF). Датотеките VCF содржат информации за варијантите пронајдени на одредени позиции во референтниот геном. За секој примерок се генерираат мерни показатели за секвенционирање и поединечни датотеки со излезни податоци. Погледнете ги деталите за секундарната и терциерната анализа во *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide* (бр. на документ 200008661).
- **Терциерна анализа**—Терциерната анализа која се спроведува со Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module се состои од пресметки за TMB и MSI, одредување придружна дијагностика, профилирање варијанти на тумор на две нивоа од клиничко значење користејќи ја базата на знаења (KB) и типот ткиво и генерирање извештај со резултати. Профилирањето тумор исто така се нарекува и опсежно геномско профилирање. Протолкуваните резултати за варијантата и резултатите од биомаркерите за TMB и MSI се резимирани во извештајот со резултати од TSO Comprehensive (EU).

Ограничувања на процедурата

Само за дијагностичка употреба *ин витро*.

- Се издава само на рецепт. Тестот мора да се користи во согласност со клиничките лабораториски прописи.

- Геномските наоди за предвидената примена дадени во [Табела 2](#) не се пропишани или конечни за означената употреба за кој било терапевтски производ.
- Не е извршена клиничка валидација на варијантите наведени во извештајот со резултати од TSO Comprehensive (EU), во делот Геномски наоди со доказ од клиничко значење (Ниво 2) и геномски наоди со потенцијално клиничко значење (Ниво 3).
- Одлуките за негата и лечењето пациенти мора да се донесуваат врз основа на независна медицинска проценка на лекарот задолжен за лекувањето, земајќи ги предвид сите применливи информации кои се однесуваат на состојбата на пациентот, како што се анамнезата, физичките прегледи, информациите од други дијагностички тестови, како и преференците на пациентот во согласност со стандардот за неџа во дадената заедница.
- Квалитетот на примерокот FFPE е крајно варијабилан. Примероците кои не биле подложени на стандардните процедури за фиксација, можеби нема да генерираат екстрахирани нуклеински киселини кои ги исполнуваат барањата за контрола на квалитетот ([Контрола на квалитет на страница 88](#)). Блоките FFPE кои биле чувани повеќе од пет години покажаа помала валидност.
- Не се евалуирани перформансите на TSO Comprehensive (EU) кај примероци добиени од пациенти на кои им била извршена трансплантација на ткиво или орган.
- Големата количина некротично ткиво ($\geq 23\%$) може да ја попречи можноста да се детектираат амплификациите на гени и фузиите PHK со анализата TSO Comprehensive (EU).
- Мутација на соматски варијанти кои поттикнуваат развој може да не биде веродостојно детектирана ако содржината на туморот (по површина) е помала од 20%.
- Исходот од микросателитна стабилност (MS-Stable) може да биде несигурен ако содржината на туморот е помала од 30%. Исходот од високо ниво на микросателити (MSI-High) е точен без оглед на содржината на туморот.
- Хемоглобинот поврзан со ткивото го намалува придружното отчитување на сплајс варијантите на MET.
- Кај високо преуредени геноми со делеции и губење на хетерозиготноста, софтверот за TSO Comprehensive (EU) може по грешка да го класифицира примерокот од ДНК како контаминиран (CONTAMINATION_SCORE > 3106 и p-вредност > 0,049).
- Негативниот резултат не ја исклучува можноста за присуство на мутација под границата на детекција (LoD) на анализата.
- Врз сензитивноста за детекција на мали варијанти ДНК може да влијаат:
 - Геномски контекст со мала сложеност.
 - Зголемување на должината на варијантата.
- Оценките за TMB може да бидат неточни во следните контексти:
 - Кога содржината на тумор ќе достигне ниво каде што се конвергираат фреквенциите на варијанта на алел (VAF) за герминативните и соматските клетки.
 - Кај популации кои не се доволно претставени во јавните бази на податоци.

- Амплификациите на гени се единствените варијанти на бројот на копии пријавени од TSO Comprehensive (EU). Анализата не ги пријавува делециите на гените.
- Алгоритмите за одредување фузии во софтверот на анализата TSO Comprehensive (EU) може да не ги вбројат доказите од отчитувањата што се протегаат надвор од означените граници на генот.
- Врз сензитивноста за детекција на фузии може да влијаат:
 - Мала сложеност на библиотечниот материјал што резултира со намален број придружни отчитувања поради отстапувањата во работниот тек на анализата (на пример, следете ги чекорите за мешање од [Денатурација и рекомбинација на РНК во двоверижна форма на страница 47](#)).
 - Кога еден ген ги опфаќа обете точки на прекин.
 - Кога неколку точки на прекин кај фузиите се во непосредна близина со еден или повеќе партнери, повеќекратните точки на прекин и партнерите може да бидат пријавени како една точка на прекин и партнер.
 - При мали медијални големини на внес. Минималната медијална големина на внес е 80 bp, но сензитивноста опаѓа во опсегот 80–100 bp.
 - При ниска сложеност на секвенцата или хомологен геномски контекст околу точките на прекин кај фузиите.
- Врз резолуцијата на гените кои се вклучени во фузија може да има влијание ако точките на прекин кај фузиите се појавуваат во геномски регии кои содржат гени кои се преклопуваат. При анализата се пријавуваат сите гени, а ако повеќе гени се преклопуваат со точката на прекин, разделени се со точка-запирка.
- Непостојаната покриеност во регијата на промотерот TERT може да доведе до No Result (нема резултат) поради малата длабочина.
- Анотацијата или грешките во KB може да дадат лажно позитивни или лажно негативни резултати, меѓу другото и испишување варијанти на погрешното ниво (помеѓу Геномски наоди со доказ од клиничко значење [Ниво 2] и геномски наоди со потенцијално клиничко значење [Ниво 3], или пак информациите за анотација во извештајот може да бидат неточни. На варијантите пријавени во резултати од CDx не влијаат анотацијата или грешките од KB. Можноста за грешки постои од следните три извори:
 - Анотација на варијанта TSO Comprehensive (EU). Стапката на грешка е приближно 0,0027%, врз основа на анализа на 2.448.350 варијанти од COSMIC v92, заради што можноста за грешка е мала.
 - Грешка во KB поради процесот на курација.
 - Релевантноста на содржината на KB се менува со текот на времето. Во овој извештај е дадено знаењето од моментот на курирање на верзијата на KB.
- TSO Comprehensive (EU) е изработен да пријави соматски варијанти кога пријавува варијанти со доказ дека имаат клиничко значење или варијанти со потенцијално клиничко значење. Како тест

само за тумор, известувањето за варијанта на герминативната линија (наследна) е можно, но ненамерно. TSO Comprehensive (EU) ја користи KB за да пријави варијанти без експлицитно да наведе дали се од герминативно или соматско потекло.

- Во KB се дадени само терапевтските, дијагностичките и прогностичките асоцијации релевантни за присутните варијанти во рамки на утврдената солидна малигна неоплазма. Подложноста или, пак, ризиците поврзани со ракот не се дел од KB.
- Во следната табела се прикажани нуклеотидните промени на три варијанти RET кои не може да се детектираат со анализата. Други нуклеотидни промени за истата промена на аминокиселините може да се детектираат.

Табела 3 Нуклеотидни промени за три варијанти RET

Промена на аминокиселина	Chr*	Позиција	Референтен алел	Алтернатива
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

* Chr = хромозом

Компоненти на производот

Тестот TSO Comprehensive (EU) се состои од следните компоненти:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) комплет (Illuminakаталогски бр. 20063092)—Комплетот вклучува реагенси со количина доволна да се генерираат 24 библиотечни материјали од ДНК и 24 библиотечни материјали од РНК. Тука се вклучени примероците од пациенти и контролните примероци. Контролните примероци се продаваат одделно (погледнете го делот [Потребни реагенси, што не се доставени на страница 18](#)).
- Knowledge Base (База на знаења): Редовно се ажурира и може да се преземе од порталот Illumina Lighthouse.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Illumina каталог # 20051843), кој ги вклучува следните компоненти:
 - TSO Comprehensive Пакети за побарувања

- TSO Comprehensive Софтверски пакет
- TSO Comprehensive USB комплет

Сервисен претставник на Illumina ја инсталира соодветната верзија на Модул за анализа TSO Comprehensive (EU) на..Local Run Manager Инструмент NextSeq 550Dx. За информации во врска со модулот за анализа, видете Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (бр. на документ 200008661).

Реагенси

Доставени реагенси

Следните реагенси се доставени во TSO Comprehensive (EU) комплетот.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, број на дел 20031127

Реагенс	Број на дел	Количина	Волумен	Активни состојки	Температура на чување
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи соли и нуклеотиди	-25°C до -15°C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи ДНК полимераза, рибонуклеаза H и нуклеотиди	-25°C до -15°C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи соли и случајни хексамери	-25°C до -15°C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи реверзна транскриптаза	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (за замрзнување) број на дел 20031118

Реагенс	Број на дел	Количина	Волумен	Активни состојки	Температура на чување
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи Т4 ДНК полимераза и полинуклеотидна киназа	-25°C до -15°C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи соли и нуклеотиди	-25°C до -15°C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи соли	-25°C до -15°C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи лигаза	-25°C до -15°C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи олигонуклеотиди за универзално секвенционирање	-25°C до -15°C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи олигонуклеотиди за универзално секвенционирање	-25°C до -15°C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи соли	-25°C до -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи ДНК полимераза и нуклеотиди	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (за во фрижидер) број на дел 20031119

Реагенс	Број на дел	Количина	Волумен	Активни состојки	Температура на чување
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи соли	2°C до 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Воден раствор кој содржи магнетни топчиња	2°C до 8°C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Раствор Tris EDTA	2°C до 8°C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, број на дел 20031120

Активни состојки: Пуфериран воден раствор кој содржи поединечни олигонуклеотидни прајмери со баркод.

**ВНИМАНИЕ**

Користете уникатни индексни прајмери (UPxx) за примероците од РНК или ДНК . Не комбинирајте ги индексните прајмери CPxx и UPxx заедно во ист библиотечен материјал.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, број на дел 20031126

Активни состојки: Пуфериран воден раствор кој содржи поединечни олигонуклеотидни прајмери со баркод.

**ВНИМАНИЕ**

За примероците ДНК користете само комбинаторни индексни прајмери (Combinatorial Index Primers (CPxx)). Не комбинирајте ги индексните прајмери CPxx и UPxx заедно во ист библиотечен материјал.

Индексен прајмер	Број на дел	Количина	Волумен	Индекс i7	Секвенца	Индекс i5	Секвенца	Температура на чување
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (за во фрижидер) број на дел 20031123

Реагенс	Број на дел	Количина	Волумен	Активни состојки	Температура на чување
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи формамид и соли	2°C до 8°C

Реагенс	Број на дел	Количина	Волумен	Активни состојки	Температура на чување
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи соли и цврсти парамагнетни топчиња ковалентно обложени со стрептавидин	2°C до 8°C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Раствор од натриум хидроксид	2°C до 8°C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Пуфериран воден раствор	2°C до 8°C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи цврсти парамагнетни топчиња	2°C до 8°C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи соли, 2-меркаптоетанол, и формамид	2°C до 8°C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи соли	2°C до 8°C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи соли	2°C до 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Воден раствор кој содржи магнетни топчиња	2°C до 8°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (за замрзнување), број на дел 20031121

Реагенс	Број на дел	Количина	Волумен	Активни состојки	Температура на чување
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи олигонуклеотиди	-25°C до -15°C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи соли	-25°C до -15°C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи детергент	-25°C до -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи ДНК полимераза и нуклеотиди	-25°C до -15°C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи прајмери P5 и P7	-25°C до -15°C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Пуфериран воден раствор кој содржи соли, 2- Меркаптоетанол и формаид	-25°C до -15°C
PhiX Internal Control (PX3 или PhiX)	20031492	1	10 µl	Пуфериран воден раствор кој содржи PhiX геномска ДНК	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Content Set, број на дел 20031122

Реагенс	Број на дел	Количина	Волумен	Активни состојки	Температура на чување
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Збирка од олигонуклеотидни сонди	-25°C до -15°C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Збирка од олигонуклеотидни сонди	-25°C до -15°C

Потребни реагенси, што не се доставени

Реагенси за преамплификација

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents — Барањата кои се однесуваат на реагенсите може да ги прочитате во делот [Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29](#).
- DNA and RNA Quantification Reagents — Барањата кои се однесуваат на реагенсите може да ги прочитате во делот [Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29](#).
- TruSight Oncology Контролни примероци:
 - TruSight Oncology Контролни примероци ДНК (Illumina каталошки број 20065041)
 - TruSight Oncology Контролни примероци РНК (Illumina каталошки број 20065042)
- Етанол (EtOH) 100% (чистота 200), молекуларно биолошка класа.
- RNase/DNase-free water

Реагенси за постамплификација

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina каталошки бр. 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- EtOH 100% (чистота 200), молекуларно биолошка класа
- RNase/DNase-free water

Чување и ракување со реагенсите

Следните реагенси се испорачуваат во замрзната состојба. Чувајте ги на температура од -25°C до -15°C.

Кутија	Број на дел	Лабораториска зона
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Пред амплификација
TruSight Oncology Comp Library Prep (за замрзнување)	20031118	Пред амплификација
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Пред амплификација

Кутија	Број на дел	Лабораториска зона
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Пред амплификација
TruSight Oncology Comp Enrichment (за замрзнување)	20031121	По амплификација
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	По амплификација

**ВНИМАНИЕ**

Не чувајте ги реагенсите во единици за складирање без-замрзнување или во преградите од вратата на фрижидерот.

Следните кутии со реагенси се испорачуваат на гел-пакувања за да се одржи температура од 0°C до 10°C. Чувајте ги на температура од 2°C до 8°C.

Кутија	Број на дел	Лабораториска зона
TruSight Oncology Comp Library Prep (за во фрижидер)	20031119	Пред амплификација
TruSight Oncology Comp Enrichment (за во фрижидер)	20031123	По амплификација

**ВНИМАНИЕ**

Не замрзнувајте ги реагенсите кои содржат топчиња (LNB1, SPB и SMB).

- Промените во физичкиот изглед на реагенсите може да укажуваат на распаѓање на материјалот. Ако дојде до физички промени (на пример, промени во бојата на реагенсот или заматеност), не користете го реагенсот.
- FSM, SSM, ERA1-B и TCB1 може да имаат честички поврзани со производот. Следете ги специфичните упатствата за ракување за секој реагенс. По извршувањето на чекорите за мешање FSM и SSM, преостанатите бели честички кои доаѓаат од производот нема да влијаат врз перформансите.
- Направена е евалуација на стабилноста на анализата TSO Comprehensive (EU) и перформансите покажаа дека комплетот е доволен за најмногу четири употреби. Реагенсите се стабилни кога се чуваат на наведените температури сè до рокот на траење наведен на етикетата од кутијата.

Опрема и материјали

Потребни опрема и материјали, не се обезбедени

Опрема и материјали за предамплификација

Опрема	Добавувач
Ултразвучен апарат со придружните додатоци Погледнете ги Поставки за конфигурација на ултразвучен апарат за фрагментација на ДНК на страница 24 .	Добавувач на општа лабораториска опрема
Термоциклер со следните спецификации: - Загреан капак кој може да се постави на температура од 30°C и 100°C (или да се исклучи ако нема можност да се постави на 30°C) - Покрива опсег на температура од 4°C до 99°C - Точност на температурата $\pm 0,25^\circ\text{C}$ - Компатибилен со плочи со 96 бунарчиња за PCR, 0,2 ml - Погледнете го делот Стапка на промена на термоциклер на страница 27	Добавувач на општа лабораториска опрема
Вортекс мешалка	Добавувач на општа лабораториска опрема
Инкубатори за микропримероци (2) со додатоци за плочи MIDI со 96 бунарчиња (2)	Добавувач на општа лабораториска опрема
Микроцентрифуга	Добавувач на општа лабораториска опрема
Плочеста центрифуга со следниве спецификации: - Компатибилна со микроплочи со 96 бунари - Капацитет од $280 \times g$ (+/- 10%)	Добавувач на општа лабораториска опрема
Мешач на плочи со следните спецификации: - Орбита од 2 mm - Може да врши протресување со 1200 rpm и 1800 rpm	Добавувач на општа лабораториска опрема
Заптивен клин или валјак	Добавувач на општа лабораториска опрема

Опрема	Добавувач
Магнетен држач со следните спецификации: • Изработен за преципитација/сепарација на парамагнетни топчиња • Магнетите се наоѓаат на страничниот дел од држачот (не на долниот дел) • Компатибилен со MIDI плочи со 96 бунари	Добавувач на општа лабораториска опрема
Прецизни пипети со кои може прецизно да се испорачаат количини од 2 µl до 1000 µl со следните спецификации: • Едноканална или повеќеканална пипета со зголемувања од 0,02 µl • Едноканална или повеќеканална пипета со зголемувања од 0,1 µl, 0,2 µl или 0,5 µl. • Едноканална или повеќеканална пипета со зголемувања од 1 µl или 2 µl Пипетите мора да се калибрираат редовно и да бидат точни во рамките на 5% од наведената количина.	Добавувач на општа лабораториска опрема
Држач за пипети	Добавувач на општа лабораториска опрема
Смрзнат или студен блок	Добавувач на општа лабораториска опрема
Серолошки пипети од 10 ml	Добавувач на општа лабораториска опрема
Лепливи заптивки за плочи со 96 бунарчиња со следните спецификации: • Се одлепуваат • Соодветни се со плочите за PCR со перваз или со полуперваз • Силно лепливи, отпорни на повеќекратни температурни промени од -20°C до 100°C • Без ДНаза/РНаза	Добавувач на општа лабораториска опрема
Епрувети за микроцентрифугирање со капацитет од 1,7 ml, без нуклеаза	Добавувач на општа лабораториска опрема
Резервоари за реагенси без нуклеаза (за една употреба, 50 ml) (или еквивалентни)	Добавувач на општа лабораториска опрема
Конусни епрувети од 15 ml	Добавувач на општа лабораториска опрема

Опрема	Добавувач
Конусни епрувети од 50 ml	Добавувач на општа лабораториска опрема
Компатибилни врвови за пипети отпорни на аеросоли	Добавувач на општа лабораториска опрема
Плочи со 96 бунарчиња за складирање, 0,8 ml (плочи MIDI)	Fisher Scientific, дел бр. AB-0859 или еквивалентен
Плочи за PCR со 96 бунарчиња компатибилни за обработка со термоциклер, 0,2 ml (полипропиленски бунарчиња)	Добавувач на општа лабораториска опрема

Опрема и материјали за постамплификација

Опрема	Добавувач
NextSeq 550Dx Инструмент	Illumina, каталошки бр. 20005715
Плочеста центрифуга со следниве спецификации: • Компатибилен со микроплочи со 96 бунари • Капацитет од 280 x g (+/- 10%)	Општ добавувач на лабораториска опрема
Термоциклер со следните спецификации: • Загреан капак (100 °C) • Покрива опсег на температура од 4 °C до 99 °C • Точност на температурата $\pm 0,25$ °C • Компатибилен со плочи со 96 бунарчиња за PCR, 0,2 ml • Погледнете го делот Стапка на промена на термоциклер на страница 27	Општ добавувач на лабораториска опрема
Вортекс мешалка	Општо добавувач на лабораториска опрема
Инкубатор за микропримероци со додаток за плочи MIDI со 96 бунарчиња	Општо добавувач на лабораториска опрема
Сув топлотен блок со следните спецификации: • Опсег на температура од 25 °C до 99 °C • Точност на температура од ± 5 °C • Проверете дали епруветите за микроцентрифугирање се компатибилни со топлотниот блок	Општ добавувач на лабораториска опрема
Трејлер за плочи со следните спецификации: • Орбита од 2 mm • Може да врши протресување со 1200 rpm и 1800 rpm	Општо добавувач на лабораториска опрема

Опрема	Добавувач
Микроцентрифуга	Општо добавувач на лабораториска опрема
Заптивен клин или валјак	Општо добавувач на лабораториска опрема
Магнетен држач со следните спецификации: • Изработен за преципитација/сепарација на парамагнетни топчиња • Магнетите се наоѓаат на страничниот дел од држачот, не на долниот дел • Компатибилен со MIDI плочи со 96 бунари	Општ добавувач на лабораториска опрема
Прецизни пипети со кои може прецизно да се испорачаат количини од 2 µl до 1000 µl со следните спецификации: • Едноканална или повеќеканална пипета со зголемувања од 0,02 µl • Едноканална или повеќеканална пипета со зголемувања од 0,1 µl, 0,2 µl, или 0,5 µl • Едноканална или повеќеканална пипета со зголемувања од 1 µl или 2 µl Пипетите мора да се калибрираат редовно и да бидат точни во рамките на 5 % од наведената количина.	Општо добавувач на лабораториска опрема
Држач за пипети	Општо добавувач на лабораториска опрема
Серолошки пипети од 10 ml	Општо добавувач на лабораториска опрема
Лепливи заптивки за плочи со 96 бунарчиња со следните спецификации: • Се одлепуваат • Соодветни се со плочите за PCR со перваз или со полу-перваз • Силно лепливи, отпорни на повеќекратни температурни промени од -20°C до 100°C • Без ДНаза/РНаза	Општ добавувач на лабораториска опрема
Епрувети за микроцентрифугирање со капацитет од 2 ml, без нуклеаза	Општ добавувач на лабораториска опрема
Епрувети за микроцентрифугирање со капацитет од 1,7 ml, без нуклеаза	Општо добавувач на лабораториска опрема

Опрема	Добавувач
Резервоари за реагенси без нуклеаза (за една употреба, 50 ml) (или еквивалентни)	Општо добавувач на лабораториска опрема
Конусни епрувети од 15 ml	Општо добавувач на лабораториска опрема
Конусни епрувети од 50 ml	Општо добавувач на лабораториска опрема
Компатибилни врвови за пипети отпорни на аеросоли	Општо добавувач на лабораториска опрема
Плочи со 96 бунарчиња за складирање, 0,8 ml (плочи MIDI)	Fisher Scientific, дел бр. AB-0859 или еквивалентен
Плочи за PCR со 96 бунарчиња компатибилни за обработка со термоциклер, 0,2 ml (полипропиленски бунарчиња)	Општо добавувач на лабораториска опрема
Смрзнат или студен блок	Општо добавувач на лабораториска опрема

Поставки за конфигурација на ултразвучен апарат за фрагментација на ДНК

Фрагментацијата, односно кретењето ДНК влијае врз перформансите на анализата така што се утврдува дистрибуцијата на големината на фрагменти, што пак, од друга страна, влијае врз покриеноста на секвенционирање. Беа евалуирани неколку конфигурации за ултразвучниот апарат и оптимизирани за анализата TSO Comprehensive (EU) ([Табела 4](#)).

- Времето на кретење беше приспособено за да се максимизира мерната единица MEDIAN_EXON_COVERAGE наведена во [Контрола на квалитет на страница 88](#). Времето на кретење (погледнете ја [Табела 4](#)) и резултатите за MEDIAN_INSERT_SIZE се разликуваа од една до друга конфигурација.
- Конфигурациите 1–4 и 6 беа тестирани со стаклени цевки со 8 ленти. Конфигурацијата 5 користеше една стаклена цевка. Капацитетите на волуменот на епруветите се прикажани во [Табела 4](#).
- За оптимизација на конфигурациите 3–6 (помали волумени на водена бања) се користеше пулсирање
- Конфигурациите 3–5 беа скратени во цевки со помал волумен. Капацитетите на волуменот на епруветите влијаат врз параметрите за кретење.
- За конфигурацијата 4 (линиски конвертор, волумен на водена бања со средна големина, дегасирана вода) беше потребно долго време за одложување на пулсот (40 секунди) за да се постигне слично MEDIAN_EXON_COVERAGE како за конфигурациите 1 и 2 при номинален внес од 40 ng.
- Оптималните поставки за конфигурацијата 3 резултираа со малку поголема дистрибуција на големината на фрагментот во споредба со другите конфигурации (MEDIAN_INSERT_SIZE беше за приближно 5–10 базни парови поголема).

- Конфигурациите 3 и 5 користеа негазирана вода и најмал волумен на водена бања.
- За конфигурациите 3 и 5 беше потребен зголемен внес на ДНК (50 ng за конфигурацијата 3, 60 ng за конфигурацијата 5) за да се постигне слично MEDIAN_EXON_COVERAGE во однос на другите 4 конфигурации, за кои се користел номиналниот внес од 40 ng.
- Кај конфигурациите 3 и 5 имаше повеќе оштетувања и/или денатурација, па со тоа и намалена ефективна маса од молекули dsDNA кои може да се искористат за подготовка на библиотечен материјал.

Центрифугирајте ги епруветите за кретење при процесот на враќање за да осигурите дека би се вратила наведената количина, бидејќи секој губиток на материјал може неповолно да влијае врз перформансите.

Табела 4 Евалуација на конфигурацијата на ултразвучниот апарат

Параметар	Конфигурација					
	1	2	3	4	5	6
Конвертор	Линија	Точка	Точка	Линија	Точка	Линија
Волумен на водена бања	5 L	5 L	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 L
Дегасирана вода	Да	Да	Не	Да	Не	Да
Ладилник за вода	Да	Да	Да	Да	Да	Да
Температура на водена бања	7°C	7°C	12°C	12°C	20°C	10°C
Максимална моќност на инцидент (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% фактор на оптоварување	30	10	30	25	20	25
Циклуси по распрснување	200	200	1000	1000	1000	600
Пулсирачки (распрскувања од 10 секунди)	Не	Не	Да	Да	Да	Да
Време на одложување на пулсирање	Н/П	Н/П	10 s	40 s	10 s	10 s
Време на кретење	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Обработка на примерок	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Големина на серија	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Големина на примерок во стаклена епрувета со 8 ленти	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Единечна епрувета (50 µl)	130 µl (или плоча microTUBE од 96)
Разместување	Н/П	Н/П	Н/П	3 mm Y @ 20 mm/s	Н/П	1,5 mm Y @ 10 mm/s
Еквивалент на внес на ДНК (за средна покриеност на егзонот)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Времето на кретење од 200 секунди се состои од распрскувања од 10 секунди со 20 повторувања.

² Времето на кретење од 320 секунди се состои од распрскувања од 10 секунди со 32 повторувања.

Стапка на промена на термоциклер

Стапката на промена на термоциклер влијае врз мерните показатели за контрола на квалитет на анализата (места на MSI кои може да се употребат, средна вредност на Bin број за CNV цел, медијална големина на внес (PHK)), како и врз придружните отчитувања од сплајс варијантите (на спојување) и фузиите. Се препорачува да се оптимизира стапката на промена на термоциклерот. На пример, моделот кој се испитуваше беше приспособен од стандардната (и максимална) стапка на промена од 5°C/s на 3°C/s за да се добијат слични резултати со други модели со пониски стандардни стапки на промена.

Собирање, транспорт и чување примероци

Придржувајте се до стандардните процедури за собирање, транспорт, сортирање и обработка на примероци.

Барања за примерокот

Ткиво FFPE

За анализата TSO Comprehensive (EU) потребни се 40 ng РНК и/или 40 ng ДНК екстрахирани од ткиво FFPE. Користењето и РНК и ДНК овозможува да се изврши анализа на сите типови варијанти кои се бараат. Ткивото треба да се фиксира со формалин кој е соодветен за молекуларни анализи (на пример, 10% формалин со неутрален пуфер). Ткивото не смее да се декалцифицира. Пред да започнете со анализата TSO Comprehensive (EU), примерокот ткиво треба да го испита патолог за да се потврди дека е соодветен за тестот. Потребна е содржина на тумор од најмалку 20% (по област) за детекција на мутации на соматски варијанти кои поттикнуваат развој. За веродостојна детекција на статусот на MSI меѓу различни примероци е потребна минимум 30% содржина на тумор. Ако примерокот се тестира со помалку од 30% содржина на тумор за да се утврдат исходите со други типови варијанти, резултатот за MS-Stable може да биде неверодостоен. Резултатот за MSI-High е точен без оглед на содржината на туморот.

Содржината на тумор за амплификација на гени и варијанти на РНК зависи од степенот на амплификација или фузиона експресија (погледнете го делот [Содржина на тумор на страница 117](#)).

За да има голема веројатност за екстракцијата на 40 ng РНК и 40 ng ДНК од различни типови цврсто ткиво, препорачаниот волумен на ткивото е $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Тој волумен е еквивалентен на кумулативната одржлива ткивна површина од $\geq 200 \text{ mm}^2$ кога се користат делови со дебелина од 5 μm , или $\geq 100 \text{ mm}^2$ кога се користат делови со дебелина од 10 μm . Кумулативната ткивна површина претставува збир на искористлива ткивна површина во сите делови доставени за екстракција. На пример, кумулативна ткивна површина од 200 mm^2 може да се добие со екстракција на четири дела од 5 μm со 50 mm^2 ткивна површина секоја, или пет дела од 10 μm со 20 mm^2 ткивна површина секоја. Некрозата на ткивото може да ја намали количината на добиената нуклеинска киселина. За да се сведе на минимум можноста за лажно негативни резултати, можете да го макродисецирате ткивото за да ја добиете посакуваната содржина на тумор што може да се искористи.

Големата количина некротично ткиво ($\geq 23\%$) може да ја попречи можноста да се детектираат амплификациите на гени и фузиите РНК со анализата TSO Comprehensive (EU). Ако деловите од примерокот содржат повеќе од 23% некроза во целата ткивна површина, тогаш мора да се изврши макродисекција на некротичното ткиво. Ако лабораторијата обработува РНК со анализата, ткивото со хемоглобин треба да се избегнува или минимизира кога се земаат парчиња од ткивниот блок. Погледнете во [Супстанции кои го попречуваат процесот на страница 107](#).

FFPE ткиво поставено на предметно стакло може да се чува до 28 дена на собна температура.

Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина

- Со помош на комерцијалните комплети кои се достапни за екстракција, екстрахирајте РНК и ДНК од примероците со ткива FFPE. Разликите во комплетите за екстракција може да влијаат врз перформансите. Погледнете го делот [Евалуација на комплетот за екстракција на нуклеинска киселина на страница 105](#).
- Не зголемувајте ја протеиназата K или еквивалентен ензим за време на екстракција од стандардната концентрација дадена во комплет за екстракција. Погледнете во [Супстанции кои го попречуваат процесот на страница 107](#).
- Екстрахираната нуклеинска киселина чувајте ја во согласност со упатствата од производителот на комплетот за екстракција.
- Чувајте ја екстрахираната ДНК до 28 дена на -25°C до -15°C.
- Чувајте ја екстрахираната РНК до 28 дена на -85°C до -65°C.
- За да не дојде до промени на концентрацијата со текот на времето, измерете ги ДНК и РНК во рок од 28 дена пред да започнете да го подготвувате библиотечниот материјал. Квантифицирајте ги РНК и ДНК со помош на методот за флуорометриска квантификација, во кој се користат бои за врзување на нуклеинската киселина. Концентрацијата на нуклеинска киселина треба да биде средната вредност од најмалку три мерења.
- За анализата се потребни 40 ng од секој примерок РНК, подготвени во RNase/DNase-free water (не е доставена), чија финална количина треба да изнесува 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- За анализата се потребни 40 ng од секој примерок gDNA со минимална концентрација на екстракција од 3,33 ng/µl. За кретењето е потребна финална количина од 52 µl (0,77 ng/µl) од кои како разредувач се користат најмалку 40 µl TEB (доставен).

Чување библиотечен материјал

Библиотечниот материјал чувајте го во плочи за PCR со ниско врзување, од 7 до 32 дена, во зависност од типот библиотечен материјал (Погледнете ја [Табела 5](#)).

Табела 5 Време на чување библиотечен материјал

Тип библиотечен материјал	Плоча	Број денови	Температура на чување
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C до -15 °C
Фрагментирана gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C до -15 °C
Пред збогатување	ALS PCR	≤ 30	-25 °C до -15 °C

Тип библиотечен материјал	Плоча	Број денови	Температура на чување
По збогатување	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C до -15 °C
PCR по збогатување	PL PCR	≤ 30	-25 °C до -15 °C
Нормализиран	NL PCR	≤ 32	-25 °C до -15 °C

Предупредувања и мерки на претпазливост

Безбедност



ПРЕДУПРЕДУВАЊЕ

Оваа група реагенси содржи потенцијално опасни хемикалии. Може да настанат лични повреди при вдишување, голтање, контакт со кожата и контакт со очите. Треба да има соодветна вентилација за ракување со опасните материјали во реагенсите. Носете заштитна опрема, вклучувајќи заштита за очи, ракавици и лабораториски мантил, соодветни за ризикот од изложеноста. Со употребените реагенси постапувајте како со хемиски отпад и фрлете ги во согласност со важечките регионални, национални и локални закони и прописи. За дополнителни еколошки, здравствени и безбедносни информации, разгледајте го листот со безбедносни податоци (SDS, Safety Data Sheet) на support.illumina.com/sds.html.

- Со сите примероци постапувајте како да се инфективни.
- Придржувајте се до рутинските лабораториски мерки за претпазливост. Не пипетирајте преку уста. Не јадејте, не пијте или не пушете во просториите предвидени за работа. Кога ракувате со примероците и реагенсите за анализа, носете ракавици за една употреба и лабораториски мантил. По ракувањето со примероците и реагенсите за анализа, темелно измијте ги рацете.

Лабораторија

- За да не дојде до контаминација, организирајте ја лабораторијата во еднонасочен работен тек. Просторот за предамплификација и постамплификација мора да има предвидена опрема и материјали (на пример, пипети, врвови за пипети, вортекс-мешалка и центрифуга). За да не дојде до пренесување на производот за амплификација или сондата, не враќајте се во просторот за предамплификација откако веќе сте влегле во просторот за постамплификација.
- Чекорите за индексирање PCR и збогатување извршете ги во просторот за постамплификација за да се спречи пренесување на производот за амплификација.

- За процедурите за подготовка на библиотечен материјал, потребна е средина која е без РНаза/ДНаза-. Целосно деконтаминирајте ги работните простори со средство за чистење и инхибиција на РНаза/ДНаза-. Користете пластика сертифицирана дека е без ДНаза, РНаза и човечка геномска ДНК.
- За процедурите за постаплификација, темелно исчистете ги работните површини и опремата, пред и по секоја процедура, со свежо подготвен раствор од 0,5% натриум хипохлорит (NaOCl). Оставете го растворот на контактните површини 10 минути, а потоа темелно избришете ги со 70% етил алкохол или изопропил алкохол.
- Користете епрувети за центрифугирање, плочи, врвови за пипети и резервоари кои не содржат нуклеаза.
- Во текот на целата анализа користете опрема што е калибрирана. Опремата калибрирајте ја согласно брзините, температурите и волумените наведени во овој протокол.
- Користете прецизни пипети за точна испорака на реагенсот и примерокот. Редовно калибрирајте ги согласно спецификациите на производителот.
- Ако користите пипети со повеќе канали, придржувајте се до следните упатства:
 - Пипетирајте најмалку $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Врвовите на бариерите треба да се добро поставени и да се соодветни за моделот и марката на пипетата со повеќе канали.
 - Прицврстете ги врвовите со завртување за да бидете сигурни дека сите врвови се подеднакво добро прицврстени.
 - Аспирирајте под агол од 90° , со еднакви количини течност во сите врвови.
 - По испораката измешајте ги сите компоненти, пипетирајќи ја горе-долу реактивната мешавина.
 - По истурањето, проверете дали е целосна испуштена течноста од секој врв.
- Користете опрема која што е предвидена за анализата, и поставете ги програмите онака како што е наведено.
- Наведените температури за термоциклерот и инкубаторот за микропримероци укажуваат на реактивната температура, што не значи дека тоа е температурата поставена за опремата.

Анализа

- Внимавајте да не дојде до вкрстена контаминација.
 - Придржувајте се до соодветните лабораториски практики кога ракувате со примероци и реагенси.
 - Користете нов потрошен лабораториски материјал и нови врвови за пипети меѓу еден и друг примерок и меѓу нанесувањето реагенси.
 - Користете врвови кои се отпорни на аеросоли како би се намалил ризикот од вкрстена контаминација.

- Кога преминувате од делот за преамплификација кон делот за постамплификација, користете еднонаочен работен тек.
- Ракувајте со, и отворете само еден индексен прајмер истовремено. По употребата веднаш затворете го капачето од епруветата со индекс. Во комплетот има дополнителни капачиња.
- Често менувајте ги ракавиците, а сменете ги и ако дојдат во контакт со индексните прајмери или со примероците.
- Отстранете ги неискористените епрувети со индексни прајмер од работниот простор.
- Не враќајте ги реагенсите во епруветите со залихи откако сте ги користеле со епрувета со лента, коритца за една употреба, или резервоар.
- Примероците измешајте ги со пипета и центрифугирајте ја плочата кога е така наведено.
- Користете микро плоча за протресување. Не ставајте ги плочите во вортекс-мешалка.
- Не разменувајте ги компонентите од анализа со различни серии комплекти со реагенси. Сериите комплекти со реагенси се идентификувани на етикетата од кутијата со комплет реагенси и на листата за главната серија.
- Треба да применувате соодветни лабораториски практики за да не дојде до контаминација на реагенсите, инструментите, примероците и библиотечниот материјал со нуклеази и производи за PCR. Контаминацијата со нуклеази и производи за PCR може да доведе до неточни и неверодостојни резултати.
- За оптимално извршување на анализата, потребен е соодветниот тип плоча и нејзино соодветно чување. Следете ги упатствата за пренос на плочи дадени во делот [Упатство за употреба на страница 42](#).
- Доколку не се придржувате до процедурите како што е наведено, може да добиете погрешни резултати или пак значително да се намали квалитетот на библиотечниот материјал.
- Ако не е назначена точка за безбедно запирање во [Упатство за употреба на страница 42](#), веднаш преминете на следниот чекор.
- Реагенсите или компонентите за анализа чувајте ги на наведената температура во зоните одредени за пред-амплификација и пост-амплификација.
- Не чувајте ги реагенсите во единици за складирање без замрзнување или во преградите од вратата на фрижидерот.
- Не замрзнувајте ги реагенсите кои содржат топчиња (LNB1, SPB и SMB).
- Не користете реагенси кои не биле соодветно чувани.
- Не отстапувајте од процедурите за мешање и ракување кои се наведени за секој реагенс. Несоодветното мешање или пак прекумерното мешање на реагенсите со вортекс-мешалка, може да доведе до неуспешни резултати од примерокот.
- FSM, SSM, ERA1-B и TCB1 може да имаат честички поврзани со производот. Следете ги упатствата за ракување за секој специфичен реагенс. По извршувањето на чекорите за мешање FSM и SSM, преостанатите бели честички кои доаѓаат од производот нема да влијаат врз перформансите.

- Подгответе нови главни мешавини и фрлете ја преостаната содржина по употребата.
- За чекорите за испирање секогаш подгответе нов 80% етанол со RNase/DNase-free water. Етанолот може да апсорбира вода од воздухот што може да влијае врз резултатите. По употребата фрлете го 80% етанол во согласност со локалните, државните и/или федералните прописи.
- Пренесете ја наведената количина елуат. Ако при елуацијата пренесете помала количина елуат од наведената, тоа може да влијае врз резултатите.
- За ултразвучните апарати применувајте ги следните насоки. Придржувајте се до упатствата од производителот.
 - Полека ставете ја gDNA во епруветата од ултразвучниот апарат како не би дошло до создавање меурчиња. Прекумерната количина меурчиња или пак слој воздух во епруветата може да резултира со нецелосна фрагментација.
 - Полека истурете ја содржината во епруветите од ултразвучниот апарат и внимавајте да не дојде до прскање.
 - За да не дојде до изместување на течноста и губење на примерокот, не ставајте го врвот од пипетата на дното од епруветата од ултразвучниот апарат кога ја отстранувате фрагментираната ДНК.
- Не пипетирајте помалку од 2 µl внес од примерок.
- Не користете пластично коритце за истурање на реагенсите за оние чекори за кои треба да додадете помалку од 10 µl материјал во секое бунарче со примерок.
- Користете пипета со тенки врвови кога пренесувате примероци фрагментирана gDNA од епруветите од ултразвучниот апарат на плочата за подготовка библиотечен материјал (Library Prep, LP).
- Не комбинирајте ги заедно адаптерите SUA1 и UMI.
- Со примероците РНК користете адаптери SUA1.
- Со примероците ДНК користете адаптери UMI.
- На секој примерок библиотечен материјал назначете му различни индексни прајмери за секој библиотечен материјал да има единствена идентификација при групирањето за секвенционирање на една проточна клетка.
- Не комбинирајте ги индексните прајмерите CPxx и UPxx во ист библиотечен материјал.
- Несовпаѓањето меѓу примероците и индексните прајмери доведува до пријавување неточни резултати поради губењето позитивна идентификација на примерокот. Внесете ги идентификациите на примероците и назначете индекси во Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Локален управник за обработка) пред да ја започнете подготовката на библиотечниот материјал. При подготовка на библиотечниот материјал, евидентирајте ги идентитетите на примероците, индексирањето и ориентацијата бунарчињата на плочата.
- За библиотечниот материјал добиен од примероци РНК, користете само индекси UPxx.
- За библиотечниот материјал добиен од примероци ДНК, користете индекси UPxx или CPxx.

- Секвенционирате максимум 8 библиотечни материјали РНК и 8 библиотечни материјали ДНК по проточна клетка. Секвенционирајте најмалку три библиотечни материјали. Следете ги упатствата дадени во [Број библиотечни материјали и избирање индекси на страница 38](#).
- По чекорот за врзување во делот [Снимање цели - прв дел на страница 66](#) и [Снимање цели - втор дел на страница 70](#), веднаш преминете на чекорот за испирање за да не дојде до сушење на пелетите со топчиња.
- При испирањето, отстранете го целиот 80% етанол од дното на бунарчињата. Докажано е дека преостанатиот етанол влијае на резултатите.
- За оптимални перформанси на анализата, придржувајте се до бројот испирања наведен во [Упатство за употреба на страница 42](#).
- При процедурата за [Нормализирање библиотечен материјал на страница 77](#), темелно суспендирајте ја пелетата со библиотечен материјал повторно за да постигнете конзистентна густина на кластерите на проточната клетка.
- Веднаш пријавете ги сериозните инциденти поврзани со производов на Illumina и надлежните органи на државите-членки во коишто се наоѓаат корисникот и пациентот.

Процедурални белешки

- Работниот тек за TSO Comprehensive (EU) може да се спроведе согласно следниот распоред:
 - Ден 1: синтеза на cDNA од примероци од РНК, ДНК фрагментација на примероци од gDNA, подготовка на библиотечен материјал и отпочнување (прва) хибридизација за следниот ден.
 - Ден 2: Збогатување, нормализација на збогатени библиотечни материјали и поставување на библиотечните материјали на инструментот Инструмент NextSeq 550Dx.Доколку не можете да го спроведете работниот тек за TSO Comprehensive (EU) согласно овој распоред, во текот на протоколот се наведени неколку точки за безбедно запирање. Ако не е назначена точка за безбедно запирање во протоколот, веднаш преминете на следниот чекор.
- Библиотечните материјали добиени од примероци од РНК и ДНК може да ги подготвувате истовремено во посебни бунарчиња.
- Во табелите за подготовка на главната мешавина е наведена прекумерната количина за да се осигури дека има доволно простор за бројот примероци кои се обработуваат.
- Користете вода со молекуларен квалитет која не содржи нуклеази.
- Откако ќе го додадете реагенсот, со аспирација измијте го врвот и потопете го еднаш во соодветното бунарче на плочата, освен ако не е поинаку наведено во процедурата.
- Како собна температура се смета температурата од 15°C до 30°C.
- Реагенсите, примероците и библиотечните материјали мора да се чуваат ладни при одредени чекори наведени во Упатството за употреба. Тоа е дефинирано како чување на мраз или еквивалентно.

Програми за термоциклер

- Пред да започнете со протоколот, програмирајте ги програмите за термоциклерот на опремата за предамплификација и постамплификација.
- Проверете дали плочите за PCR добро се вклопуваат во термоциклерот.
- Користете плочи кои ги препорачал производителот на термоциклерот.

Запечатување и отпечатување на плочата

- Плочите секогаш запечатувајте ги со нов леплив запечатувач за плочи. Не користете ги запечатувачите повторно.
- За да ја запечатите плочата, нанесете го лепливиот капак врз плочата, со помош на запечатувачки клин или валјак.
- Пред да започнете со чекорите од протоколот, секогаш запечатете ја плочата со 96 бунарчиња со нова леплива заптивка за плочи.
 - Чекори за протресување на плочата
 - Чекори за центрифугирање
 - Чекори за термоциклер
 - Хибридизации
 - Долготрајно чување
- За да го намалите ризикот од вкрстена контаминација и испарување, рабовите и бунарчињата треба да се запечатени.
- Ставете ја плочата врз рамна површина пред полека да го отстраните запечатувачот.
- Пред отворањето, доколку забележите некаква течност или кондензација на запечатувачот или, пак, на страничните сидови од бунарчињата на плочата, центрифугирајте 1 минута на 280 × g.
- Користете лепливи запечатувачи за плочи кои се ефективни на температури од -20°C до 100°C и кои се соодветни за плочи за PCR со перваз или со полуперваз.

Опрема

- Пред да започне со анализата, персоналот во лабораторијата треба да се запознае со упатствата од производителот за начинот на работа и одржување на опремата.

Тип плочи и преноси на плочи

- За оптимално извршување на анализата, потребен е соодветниот тип плоча и нејзино соодветно чување.
- При пренос на содржини помеѓу плочите, пренесете ја наведената содржина од секое бунарче на плочата во соодветното бунарче на целната плоча.

- Може да користите пипети со повеќе канали кога пренесувате примероци помеѓу плочите или лентите од епруветите.
- При протресување на плочите, придржувајте се до следните насоки.
 - Користете шејкер за плочи за протресување на плочите. Не ставајте ги плочите во вортекс-мешалка.
 - Плочите за PCR протресувајте ги на 1200 rpm.
 - Плочите MIDI протресувајте ги на 1800 rpm.
 - Придржувајте се до упатствата од производителот како би биле сигурни дека шејкерот цврсто ја држи плочата.

Центрифугирање

- Ако во упатството за протоколот стои дека треба да се изврши кратко центрифугирање, центрифугирајте 1 минута на $280 \times g$.
- Ако забележите течност на запечатувачот или пак на страничните делови од бунарчето, центрифугирајте ја плочата 1 минута на $280 \times g$.

Ракување со реагенси

- Веднаш по употребата, добро затворете ги сите епрувети за да го ограничите испарувањето и за да не дојде до контаминација.
- Кога веќе нема да ви се потребни за една процедура, вратете ги реагенсите на наведената температура за чување.
- Придржувајте се до упатството за подготовка на реагенси кое му претходи на секој дел за постапката, во [Упатство за употреба на страница 42](#).
- Подгответе ја потребната количина од главната мешавина, мешавината за елуирање и 80% етанол за бројот примероци кои ги обработувате.
- Количините дадени во табелите за главната мешавина и за раствор содржат вишок. Пресметките за прекумерна количина се следните.
 - [Табела 14](#)
 - Количина за FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{број примероци} + \text{контролни примероци}) \times (1,25)$.
 - Количина за RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{број примероци} + \text{контролни примероци}) \times (1,25)$.
 - [Табела 21](#)
 - Количина за ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{број на библиотечни материјали}) \times (1,20)$.
 - Количина за ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{број на библиотечни материјали}) \times (1,20)$.
 - [Табела 29](#)
 - Количина за EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{број библиотечни материјали}) \times (1,364)$.
 - Количина за HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{број библиотечни материјали}) \times (1,364)$.

- **Табела 30**

- Количина за EE2 = (20,9 µl) x (број библиотечни материјали) x (1,364).
- Количина за HP3 = (1,1 µl) x (број библиотечни материјали) x (1,364).

- **Табела 36**

- Количина за LNA1 = (38,1 µl) x (број библиотечни материјали) x (2,0).
- Количина за LNB1 = (6,9 µl) x (број библиотечни материјали) x (2,0).

- **Табела 37**

- Количина за EE2 = (30,4 µl) x (број библиотечни материјали) x (1,25).
- Количина за HP3 = (1,6 µl) x (број библиотечни материјали) x (1,25).

Комплекти адаптери

- Анализата TSO Comprehensive (EU) ги вклучува адаптерите SUA1 и UMI.
- Адаптерите SUA1 се користат со примероците РНК. Не се за употреба со примероци ДНК.
- Адаптерите UMI се користат со примероците ДНК. Не се за употреба со примероци РНК.

Ракување со топчиња

- Анализата TSO Comprehensive (EU) доаѓа со три типа топчиња (SPB, SMB и LNB1). Користете го соодветниот тип топчиња за време на процедурата.
- Спроведете го соодветниот број испирања за секој тип топче.
- Топчињата пред употреба треба да бидат на собна температура.
- За да бидат хомогени, мешајте ги топчињата 1 минута пред употребата.
- Ако ги мешате топчињата со пипета, придржувајте се до следните упатства:
 - Користете соодветна пипета и врв со соодветна големина за количината што ја мешате.
 - Постапките за количина прилагодете ги на приближно 50–75% од количината на примерокот.
 - Пипетирајте полека, без да го пуштате клипот.
 - Внимавајте да не дојде до прскање и создавање меурчиња.
 - Врвот од пипетата ставете го врз пелетата и истурете директно во неа за да ги испуштите топчињата од бунарчето или епруветата.
 - Пелетата со топчиња треба да биде целосно потопена во раствор. Растворот треба да е со темно-кафена боја и со хомогена конзистенција.
 - Направете проценка дали има пелета со топчиња. Внимателно аспирирајте го целиот раствор со топчиња од бунарчето во врвот и погледнете го дното на бунарчето.
- Ако ги аспирирате топчињата во врвовите од пипетата за време на чекорите за магнетна сепарација, вратете ги назад во бунарчето на плочата на магнетниот држач. Почекајте течноста да се разбистри (околу 2 минути), пред да преминете на следниот чекор од процедурата.

- При испирање на топчињата:
 - Користете го препорачаниот магнетен држач за плочата.
 - Течноста истурете ја директно врз пелетата за да се навлажнат топчињата на страничните делови од бунарчето.
 - Оставете ја плочата врз магнетниот држач сè додека процедурата не ви наложи да ја тргнете.
 - Не тресете ја плочата додека стои на магнетниот држач.
 - Не мрдајте ја пелетата додека стои на магнетниот држач.
- Додека ги испирате топчињата или го отстранувате супернатантот, врвовите од пипетите насочете ги кон дното од бунарчињата за да не дојде до создавање вакуум и повлекување на растворот во филтрите на врвот од пипетата.

Број библиотечни материјали и избирање индекси

Пред да ја поставите обработката, испланирајте го бројот примероци библиотечен материјал и индекси на примероци за обработката со секвенционирање. Во следните насоки за бројот на примероците се вклучени позитивните контролни примероци, но изземени се негативните/контролните примероци без шаблон (NTC). NTC мора да се додадат кон предвидената обработка како дополнителен примерок.

За TSO Comprehensive (EU), следете ги упатствата во [Табела 6](#) и [Табела 7](#) за да го одредите бројот на библиотечни материјали на РНК и/или на ДНК за секвенционирање на една проточна ќелија. Погледнете ја [Табела 6](#) ако секвенционирате библиотечни материјали на РНК *или на* ДНК одделно. Погледнете ја [Табела 7](#) ако секвенционирате библиотечни материјали на РНК *и на* ДНК на истата проточна ќелија.

Табела 6 Секвенционирање библиотечни материјали на РНК *или* на ДНК

Тип библиотечен материјал	Минимум*	Максимум*
Само РНК	3	16
Само ДНК	3	8

* NTC не придонесуваат кон сложеноста.

Табела 7 Секвенционирање библиотечни материјали на РНК *и* на ДНК на истата проточна ќелија

Тип библиотечен материјал	Минимум*	Максимум*
РНК	3	8
ДНК	3	8

* NTC не придонесуваат кон сложеноста.

За *оптимална употреба на реагенсот* при секвенционирање на библиотечните материјали на ДНКТСО Comprehensive (EU) и Инструмент NextSeq 550Dхна РНК со на, секвенционирајте 8 библиотечни материјалина РНК и 8 библиотечни материјали на ДНК по проточна ќелија.

Индексните прајмери на уникатен начин го идентификуваат секој примерок, а со цел библиотечните материјали да може заедно да се групираат за секвенционирање на една проточна ќелија.

Компатибилните комбинации на индекси се прикажуваат на екранот Create Run (Креирање обработка) за време на поставувањето на обработката на Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. При подготовка на библиотечниот материјал, додајте го индексниот прајмер во секој примерок библиотечен материјал. *Користете различна мешавина од индексни прајмери за секој примерок библиотечен материјал.*

Индексните прајмери што ги користите со примероците треба да се совпаѓаат со индексите што ги избирате за анализа со Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module.

Несовпаѓањето доведува до пријавување неточни резултати поради губењето на позитивната идентификација на примерокот.

Постојат два типа индекси во анализата TSO Comprehensive (EU).

- **Индекси UPxx**—Користете индекси UPxx за библиотечни материјали добиени од примероци од РНК или ДНК.
- **Индекси CPxx**—Користете индекси CPxx за библиотечни материјали добиени од примероци од ДНК. Не употребувајте ги индексите CPxx за библиотечни материјали добиени од РНК или, пак, ако секвенционирате вкупно само три библиотечни материјали на ДНК.

Ако секвенционирате само три библиотечни материјали, потребно е следново.

- Библиотечните материјали мора да бидат или само ДНК или само РНК.
- Не користете сетови на индексите CPxx.
- Потребен е еден од следните сетови на индексите UPxx за да има доволна разновидност:
 - UP01, UP02 и UP03
 - UP04, UP05 и UP06
 - UP07, UP08 и UP09
 - UP10, UP11 и UP12

На пример, на првиот библиотечен материјал му се припишува UP01, на вториот UP02 и на третиот UP03.

TruSight Oncology Контроли

За TSO Comprehensive (EU) се потребни TruSight Oncology Controls, коишто се состојат од контролен примерок од TruSight Oncology ДНК и контролен примерок од TruSight Oncology РНК како позитивни контролни примероци. При секоја подготовка на библиотечен материјал, користете ги контролните примероци од ДНК TruSight Oncology за секоја обработка на ДНК со секвенционирање и контролните

примероци од РНК TruSight Oncology за секоја обработка на РНК со секвенционирање (користете ги контролните примероци и за комбинирани обработки на ДНК и на РНК). За секоја планирана секвенционирана обработка се подготвува единствен позитивен контролен примерок. Повеќе информации може да најдете во Приложено упатство за TruSight™ Oncology Controls (200009919)

Влезната количина на позитивна контрола е 40 ng за ДНК и РНК.

Користете го соодветниот NTC при секоја подготовка на библиотечен материјал од РНК и ДНК. NTC се секвенционира неколку пати при една подготовка на библиотечен материјал. Следете ги овие упатства за TruSight Oncology Controls :

- Подгответе го библиотечниот материјал од позитивните контролни примероци и контролните примероци без шаблон идентично со примероците.
- Користете ТЕВ за ДНК NTC.
- Користете вода без ДНaza/РНaza за РНК NTC.
- Позитивните контролни примероци се вклучени во барањето за максималниот библиотечен материјал.
- NTC не се вклучени во барањето за минимален библиотечен материјал.
- Кога секвенционирате само 3 библиотечни материјали, користете UP-индекси за NTC.
- Бидејќи NTC се секвенционира повеќе пати, индексите што сте ги избрале за тој контролен примерок, не смее да се повторат при подготовката на библиотечниот материјал.

Во следните табели е даден пример за распоредот на плочите при подготовка на библиотечен материјал. Секоја нумерирана колона претставува единечна обработка со секвенционирање. Ако секвенционирате истовремено библиотечен материјал од ДНК и од РНК, секоја соодветна група колони претставува единечна обработка со секвенционирање (на пример, колона 1 и колона 7). NTC се секвенционира за секоја колона или група колони.

Табела 8 Подготовка на библиотечен материјал за една обработка со шест примероци од пациент

	1	2	3	4	5	6	7
A	Поз. контролен примерок од ДНК	празно	празно	празно	празно	празно	Поз. контролен примерок од РНК
B	ДНК 1	празно	празно	празно	празно	празно	РНК 1
C	ДНК 2	празно	празно	празно	празно	празно	РНК 2
D	ДНК 3	празно	празно	празно	празно	празно	РНК 3
E	ДНК 4	празно	празно	празно	празно	празно	РНК 4
F	ДНК 5	празно	празно	празно	празно	празно	РНК 5
G	ДНК 6	празно	празно	празно	празно	празно	РНК 6
H	ДНК NTC	празно	празно	празно	празно	празно	РНК NTC

Табела 9 Подготовка на библиотечен материјал за три обработки со 20 примероци од пациент

	1	2	3	4	5	6	7
A	Поз. контролен примерок од ДНК	Поз. контролен примерок од ДНК	Поз. контролен примерок од ДНК	празно	Поз. контролен примерок од РНК	Поз. контролен примерок од РНК	Поз. контролен примерок од РНК
B	ДНК 1	ДНК 7	ДНК 14	празно	РНК 1	РНК 7	РНК 14
C	ДНК 2	ДНК 8	ДНК 15	празно	РНК 2	РНК 8	РНК 15
D	ДНК 3	ДНК 9	ДНК 16	празно	РНК 3	РНК 9	РНК 16
E	ДНК 4	ДНК 10	ДНК 17	празно	РНК 4	РНК 10	РНК 17
F	ДНК 5	ДНК 11	ДНК 18	празно	РНК 5	РНК 11	РНК 18
G	ДНК 6	ДНК 12	ДНК 19	празно	РНК 6	РНК 12	РНК 19
H	ДНК NTC	ДНК 13	ДНК 20	празно	РНК NTC	РНК 13	РНК 20

Упатство за употреба

Прегледот на работниот тек на TSO Comprehensive (EU) е прикажан на [Слика 1](#) и [Слика 2](#).

Работен тек за подготовка на библиотечен материјал

[Слика 1](#) е прикажан работниот тек за подготовка на библиотечен материјал за TSO Comprehensive (EU). Библиотечниот материјал добиен од примероци од РНК и ДНК може истовремено да се подготвува во посебни бунарчиња. Позитивните контролни примероци и контролните примероци без шаблон се обработуваат на ист начин како и примероците. Точките за безбедно запирање се означени помеѓу чекорите.

Пред да го стартувате протоколот, внесете информации за извршување и примероци во Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. Погледнете го *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide* (бр. на документ 200008661).

Слика 1 TSO Comprehensive (EU) Работен тек (Дел 1)

Ден 1

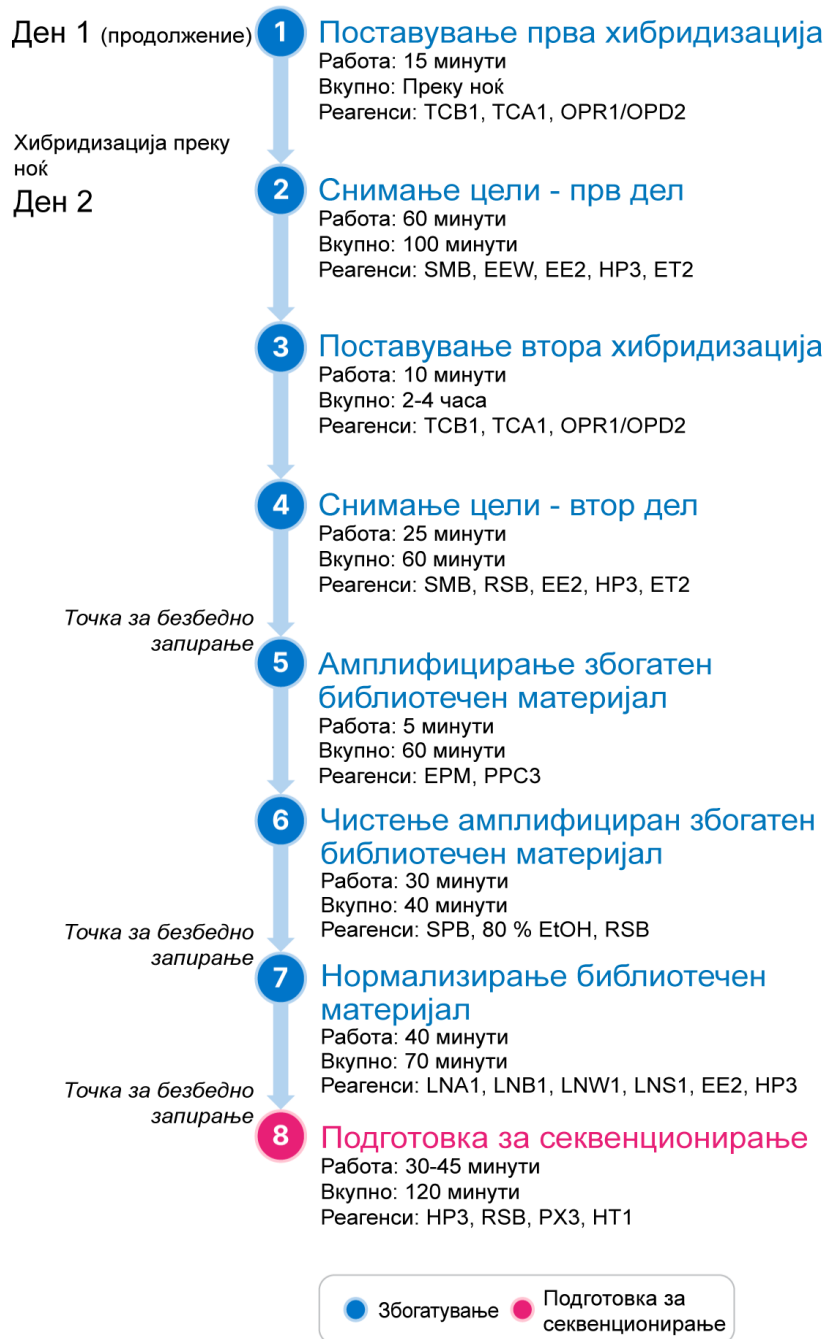


* Времето на работа и вкупните времиња се приближни.

Работен тек за збогатување

На [Слика 2](#) е прикажан работниот тек за збогатување за TSO Comprehensive (EU). Точките за безбедно запирање се означени помеѓу чекорите.

Слика 2 TSO Comprehensive (EU) Работен тек (Дел 2)



Програмирање термоциклери

Пред да започнете со анализата, зачувајте ги следните програми на термоциклерите за предамплификација и постаплификација.

Табела 10 Програми за термоциклер за предамплификација

Чекор од процедурата	Назив на програмата	Температура на капак	Реактивен волумен	Параметри за термоциклер
Денатурација и рекомбинација на РНК во двоверижна форма	LQ-RNA	100°C	17 µl	• 5 минути на 65°C • 1 минута на 4°C • Држете на 4°C
Синтетизирање на првата нишка cDNA	1-ва SS	100°C	25 µl	• 10 минути на 25°C • 15 минути на 42°C • 15 минути на 70°C • 1 минута на 4°C • Држете на 4°C
Синтетизирање на втората нишка cDNA	2-ра SS	30°C	50 µl	• 25 минути на 16°C • 1 минута на 4°C • Држете на 4°C

ЗАБЕЛЕШКА Ако температурата на капакот за 2-та SS не може да се постави на 30°C, исклучете ја опцијата за претходно загревање на капакот.

Табела 11 Програми за термоциклер за постаплификација

Чекор од процедурата	Назив на програмата	Температура на капак	Реактивен волумен	Параметри за термоциклер
Индексирање PCR	I-PCR	100°C	50 µl	• 30 секунди на 98°C • 15 циклуси: • 10 секунди на 98°C • 30 секунди на 60°C • 30 секунди на 72°C • 5 минути на 72°C • Држете на 10°C

Чекор од процедурата	Назив на програмата	Температура на капак	Реактивен волумен	Параметри за термоциклер
Прва хибридизација	HYB1	100°C	50 µl	• 10 минути на 95°C • 2 минути и 30 секунди на 85°C • 2 минути и 30 секунди на 75°C • 2 минути и 30 секунди на 65°C • Задржете 8 до 24 часа на 57°C
Извршете втора хибридизација	HYB2	100°C	50 µl	• 10 минути на 95°C • 2 минути и 30 секунди на 85°C • 2 минути и 30 секунди на 75°C • 2 минути и 30 секунди на 65°C • Задржете 1,5 до 4 часа на 57°C
Амплифицирање збогатен библиотечен материјал	EL-PCR	100°C	50 µl	• 30 секунди на 98°C • 18 циклуси: • 10 секунди на 98°C • 30 секунди на 60°C • 30 секунди на 72°C • 5 минути на 72°C • Држете на 10°C

Подготовка за протоколот

Оваа подготовка е потребна за извршување на чекорите од протоколот што водат до следната безбедна точка за запирање.



ВНИМАНИЕ

За сите процедури од работниот тек, задолжително е средината да биде вода без RNase/DNase.

1. Темелно деконтаминирајте ги работните простори со средство за чистење и инхибиција на RNase/DNase.
2. Проверете дали се поставени програмите за термоциклер за предамплификација. Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
3. Поставете го ултразвучниот апарат во согласност со упатствата од производителот.

4. Ако обработувате само примероци ДНК, преминете директно на [Фрагментирање gDNA на страница 52](#).
5. Извадете ги контролните примероци РНК од местото за складирање.
6. Извадете ги епруветите со реагенси од кутијата и следете ги упатствата за одмрзнување.

Табела 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (број на дел 20031127)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
EPH3	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Денатурација и рекомбинација на РНК во двоверижна форма
FSM	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Синтетизирање на првата нишка cDNA
RVT	-25°C до -15°C	Чувајте го ладен.	Синтетизирање на првата нишка cDNA
SSM	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Синтетизирање на втората нишка cDNA

Табела 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (за во фрижидер) (број на дел 20031119)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
SPB (светлозелена етикета)	2°C до 8°C	Оставете на собна температура 30 минути.	Чистење cDNA
RSB	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Чистење cDNA

Денатурација и рекомбинација на РНК во двоверижна форма

Со овој процес се врши денатурација на прочистена РНК и се прајмира со произволни хексамери во подготовката за синтеза на cDNA.

Подготовка

1. Подгответе ги следните реагенси.
 - EPH3—Тргнете настрана.
 - FSM—Измешајте со вортекс-мешалка. Кратко центрифугирајте, а потоа пипетирајте за да измешате.
Реагенсот може да содржи бели честички кои доаѓаат од производот. Не треба ништо да преземете. Не влијаат врз перформансите на производот.

- RVT—Кратко центрифугирајте, а потоа пипетирајте за да измешате. Чувајте го ладен.

ЗАБЕЛЕШКА RVT е вискозен раствор. Додека пипетирате, сведете го создавањето меурчиња на минимум.

- Во епрувета за микроцентрифугирање комбинирајте ги следните количини за подготовка на главната мешавина FSM + RVT.

Табела 14 Главна мешавина FSM + RVT

Компонента за главната мешавина	4 библиотечни материјали (µl)	8 библиотечни материјали (µl)	16 библиотечни материјали (µl)	24 библиотечни материјали (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Во оваа табела е дадена прекумерната количина. Пресметките може да ги најдете во делот [Ракување со реагенси на страница 36](#).

- Пипетирајте 10 пати за да измешате.
- Чувајте ја главната мешавина FSM + RVT ладна сè до [Синтетизирање на првата нишка cDNA на страница 49](#).

Процедура

- Чувајте ги екстрахираните примероци РНК и контролите РНК ладни додека се одмрзнуваат. Контролните примероци РНК обработувајте ги како примероци во останатиот дел од протоколот.
- Чувајте ја РНК ладна кога не ја користите. За начинот на квантификација на примероците може да прочитате во делот [Барања за примерокот на страница 28](#).
- За да го измешате, пипетирајте го секој примерок РНК 10 пати.
- Користете RNase/DNase-free water за подготовка на 40 ng од секој примерок РНК во финална количина од 8,5 µl (4,7 ng/µl).
За контролните примероци РНК, користете ја концентрацијата наведена на етикетата од епруветата.
- Означете со CF (фрагменти cDNA) нова плоча за PCR со 96 бунарчиња.
- Додајте 8,5 µl од секој примерок РНК во одделно бунарче на плочата за CF PCR.
- Проверете дали распоредот на плочата за примероци и индексите за секој примерок одговараат на планираната обработка во Модул за анализа TSO Comprehensive (EU) за време на поставувањето на обработката.
- Измешајте го EPH3 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте го.
- Додајте 8,5 µl EPH3 во секое бунарче за примерок.
- На плочата за CF PCR ставете леплива заптивка за плоча.

**ВНИМАНИЕ**

Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.

11. Протресете 1 минута на 1200 rpm.
12. Центрифугирајте ја 1 минута на 280 × g.
13. Ставете на термоциклер и стартувајте ја програмата за LQ-RNA.
Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
14. Кога примероците ќе достигнат 4°C, држете ја така 1 минута. Веднаш преминете на следниот чекор.

Синтетизирање на првата нишка cDNA

Во овој процес обратно се транскрибираат фрагменти РНК прајмирани со произволни хексамери во првата нишка cDNA со помош на реверзна транскриптаза.

Процедура

1. Извадете ја плочата за CF PCR од термоциклерот.
2. Пипетирајте 10 пати за да ја измешате главната мешавина FSM + RVT. Проверете дали мешавината FSM + RVT е целосно хомогена.
3. Додадете 8 µl од главната мешавина FSM + RVT во секое бунарче за примерок.
4. Пипетирајте 10 пати за да измешате.
5. Фрлете ја преостанатата главна мешавина FSM + RVT.
6. На плочата за CF PCR ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
7. Протресете 1 минута на 1200 rpm.
8. Центрифугирајте ја 1 минута на 280 × g.
9. Ставете ја на термоциклер и стартувајте ја програмата 1-ва SS.
Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
10. Кога примероците ќе достигнат температура од 4°C, веднаш преминете на следниот чекор.
Примероците од првата нишка може да се задржат на температура од 4°C најмногу 5 минути.

Синтетизирање на втората нишка cDNA

При овој процес се отстранува шаблонот на РНК и се синтетизира двоверижна cDNA.

Подготовка

1. Подгответе SSM:
 - а. SSM—превртете 10 пати за да измешате.

- б. Кратко центрифугирајте. Реагенсот може да содржи бели честички кои доаѓаат од производот. Не треба ништо да преземете. Не влијаат врз перформансите на производот.

Процедура

1. Извадете ја плочата за CF PCR од термоциклерот.
2. Додадете 25 µl SSM во секое бунарче за примерок.
3. На плочата за CF PCR ставете леплива заптивка за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
4. Протресете 1 минута на 1200 rpm.
5. Центрифугирајте ја 1 минута на 280 × g.
6. Ставете ја на термоциклер и стартувајте ја програмата 2-ра SS.
Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
7. Кога примероците ќе достигнат температура од 4 °C, задржете 1 минута и веднаш преминете на следниот чекор.

Чистење cDNA

Во овој процес се прочистува cDNA од непожелните компоненти на реакција со помош на SPB. Топчињата се измиваат двапати со свеж 80% EtOH. cDNA се елуира со RSB.

Подготовка

1. Подгответе ги следните реагенси.
 - SPB—Пред употреба оставете ги топчињата на собна температура 30 минути.
 - RSB—Оставете го настрана за употреба во процедурата.
2. На следниот начин подгответе 80% свеж EtOH во конусна епрувета од 15 ml или од 50 ml.

Табела 15 Подготовка на 80% свеж EtOH

Реагенс	4 библиотечни материјали	8 библиотечни материјали	16 библиотечни материјали	24 библиотечни материјали
100% EtOH, чист	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Измешајте 80% свеж EtOH со вортекс-мешалка.
4. Означете со BIND1 нова плоча со 96 бунарчиња за MIDI (врзување cDNA).
5. Покријте ја и тргнете ја настрана.
6. Поставете го магнетот.

Процедура

Врзување

1. Извадете ја плочата за CF PCR од термоциклерот.
2. Мешајте ги SPB со вортекс-мешалка 1 минута за повторно да ги суспендирате топчињата.
3. Веднаш додајте 90 µl SPB во секое бунарче со примерок на плочата за BIND1 MIDI.
Ако користите коритце за дозирање на SPB, вклучете го факторот за прекумерност од 1,15 кога аликвотирате доволно материјал по примерок. Откако ќе додадете SPB во секое бунарче со примерок, фрлете го материјалот што ќе ви преостане.
4. Пренесете ја целата количина (50 µl) за секој примерок од плочата за CF PCR во соодветното бунарче на плочата за BIND1 MIDI.
5. Фрлете ја празната плоча за CF PCR.
6. На плочата за BIND1 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
7. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
8. Инкубирајте на собна температура 5 минути.
9. Оставете ја плочата за BIND1 MIDI на магнетен држач 5 минути.
10. Чувајте ја плочата на магнетниот држач. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче со примерок.

Испирање

1. Испирајте ги топчињата на следниот начин.
 - a. Оставете ја плочата за BIND1 MIDI врз магнетниот држач и додајте 200 µl свеж 80% EtOH во секое бунарче.
 - b. Почекајте 30 секунди.
 - c. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче со примерок.
2. Исперете ги топчињата по **вторпат**.
3. Употребете пипета со тенки врвови за да го отстраните преостанатиот EtOH од секое бунарче.
4. Фрлете го неискористениот 80% EtOH.

Елуирање

1. Извадете ја плочата за BIND1MIDI од магнетниот држач.
2. Превртете го или мешајте го RSB со вортекс-мешалка.
3. Додајте 22 µl RSB во секое бунарче за примерок.
4. На плочата за BIND1 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.

Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.

- Протресете 2 минути на 1800 rpm.
- Инкубирајте на собна температура 2 минути.
- Ставете ја на магнетен држач 2 минути.
- Означете со PCF нова плоча со 96 бунарчиња за MIDI (пречистени фрагменти cDNA).
Ако запираете кај [ТОЧКА ЗА БЕЗБЕДНО ЗАПИРАЊЕ](#) на страница 52, употребете плоча за PCR.
- Пренесете 20 µl елуат од секое бунарче со примерок од плочата BIND1 MIDI во соодветното бунарче на плочата за PCF.
- Фрлете ја празната плоча BIND1 MIDI.
- Додајте 30 µl RSB во секое бунарче за примерок на плочата за PCF.
- Пипетирајте 10 пати за да измешате.
- Ставете леплива заптивка за плоча на плочата за PCF и чувајте ја студена.
- Вратете ги EPH3, FSM, RVT и SSM на местото за складирање.
- Ако обработувате примероци добиени само од PHK (cDNA) и не застанете на точката за безбедно запирање, преминете на делот [Извршување поправка на краевите и А-додаток на страница 56](#).

ТОЧКА ЗА БЕЗБЕДНО ЗАПИРАЊЕ

Ако запрете, центрифугирајте ја плочата за PCF PCR на 280 × g 1 минута и чувајте ја на температура од -25°C до -15°C до 7 дена.

Подготовка за протоколот

Оваа подготовка е потребна за извршување на чекорите од протоколот што водат до следната безбедна точка за запирање.

- Извадете ги контролните примероци ДНК од местото за складирање.
- Извадете ја епруветата со реагенс од кутијата и следете ги упатствата за одмрзнување.

Табела 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (за во фрижидер) (број на дел 20031119)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
TEB	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Фрагментирање gDNA

Фрагментирање gDNA

При овој процес се фрагментира gDNA и се генерираат фрагменти dsDNA со продолжетоци од 3' или 5'.

Подготовка

- При квантификација на примероци, придржувајте се до упатствата дадени во [Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29](#).

2. ТЕВ—Превртете го или мешајте го со вортекс-мешалка.

Процедура

Подготовка на плочата

Изберете една од следните три опции за подготовка на плочата:

- Примероците gDNA обработете ги истовремено со примероците cDNA во плочата за PCF MIDI.
 - a. Плочата за PCF MIDI означете ја со LP (подготовка на библиотечен материјал).
 - b. Чувајте ја студена и тргнете ја настрана за употреба во [Пренесување фрагментирана ДНК на страница 54](#).
- Обработете ги примероците gDNA истовремено со примероците cDNA додека плочата за PCF PCR е замрзната.
 - a. Одмрзнете ја плочата за PCF PCR на собна температура.
 - b. Центрифугирајте ја 1 минута на 280 × g.
 - c. Пипетирајте 10 пати за да измешате.
 - d. Со LP (подготовка на библиотечен материјал) означете нова плоча MIDI со 96 бунарчиња.
 - e. Пренесете ги целите примероци од по 50 µl од плочата PCF PCR во соодветното бунарче на плочата LP MIDI.
 - f. Фрлете ја плочата PCF PCR.
 - g. Ставете леплива заптивка за плоча и чувајте ја студена до [Пренесување фрагментирана ДНК на страница 54](#).
- Обработете само примероци gDNA.
 - a. Со LP (подготовка на библиотечен материјал) означете нова плоча MIDI со 96 бунарчиња. Ако запираете кај [Точка за безбедно запирање на страница 54](#), употребете плоча за PCR.
 - b. Покријте ја и тргнете ја настрана за употреба во [Пренесување фрагментирана ДНК на страница 54](#).

Разблажување gDNA

1. Одмрзнете ги примероците gDNA и контролните примероци ДНК на собна температура.
2. За да го измешате примерокот gDNA, пипетирајте го секој примерок 10 пати.
3. Кратко центрифугирајте ја епруветата за да ги соберете капките.
4. Превртете го или мешајте го ТЕВ со вортекс-мешалка.
5. Со помош на ТЕВ, подгответе го секој примерок gDNA во финална количина од 52 µl. Количините за внес и минималните концентрации според тип примерок се дадени во следната табела.
 - За анализата е потребна минимална концентрација од екстракцијата за да се добијат најмалку 40 µl ТЕВ од количината од 52 µl.

- За контролните примероци ДНК, користете ја концентрацијата наведена на етикетата од епруветата.
- За да не дојде до губење на примерокот, не пипетирајте помалку од 2 µl од примерокот во овој раствор.

Тип примерок	Влезна количина (ng)	Минимална концентрација (ng/µl)
FFPE	(40)	3.33
Контролен примерок	(40)	Прочитајте на етикетата од епруветата

Фрагментирање

1. Додајте 52 µl од секој примерок од геномска ДНК во посебно бунарче од епруветата на ултразвучниот апарат.



ВНИМАНИЕ

Полека ставете ја gDNA во епруветата за да не дојде до воздушни празнини на дното од епруветата. Повеќе информации може да најдете во делот [Анализа на страница 31](#) и во упатството од производителот.

2. Евидентирајте ја насоката на лентата.
3. Фрагментирајте ја gDNA во фрагменти со ултразвучниот апарат.

Пренесување фрагментирана ДНК

1. Постапеноста на плочата за примерок и индексите за секој примерок треба да соодветствуваат со обработката што сте ја избале за анализа со Модул за анализа TSO Comprehensive (EU).
2. За обнова на примерокот, следете ги упатствата на производителот на ултразвучниот апарат. За некои типови епрувети за ултразвучен апарат ќе биде потребно центрифугирање за да се консолидира примерокот во епруветата.
3. За секој фрагментиран примерок gDNA, употребете пипета со тенки врвови за да направите три пренесувања од 16,7 µl во празно бунарче на плочата за LP MIDI.
4. На плочата за LP MIDI ставете леплива заптивка за плоча.

ТОЧКА ЗА БЕЗБЕДНО ЗАПИРАЊЕ

Ако запрете, на плочата за LS PCR ставете леплива заптивка за плоча и центрифугирајте ја 1 минута на 280 x g. Чувајте ја на температура од -25 °C до -15 °C најмногу 7 дена.

Подготовка за протоколот

Оваа подготовка е потребна за извршување на чекорите од протоколот што водат до следната безбедна точка за запирање.

Проверете дали се поставени програмите за термоциклер за постамплификација. Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).

1. Подгответе кофа со мраз или еквивалентно.
2. Извадете ги епруветите со реагенси од кутијата и следете ги упатствата за одмрзнување.

Табела 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (за замрзнување) Box (број на дел 20031118)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
ERA1-A	-25°C до -15°C	Чувајте го ладен.	Извршување поправка на краевите и А-додаток
ERA1-B	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Извршување поправка на краевите и А-додаток
ALB1	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Лигација на адаптери
LIG3	-25°C до -15°C	Чувајте го ладен.	Лигација на адаптери
SUA1 (сино капаче)	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Лигација на адаптери
UMI (бело капаче)	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Лигација на адаптери
STL	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Лигација на адаптери
EPM	-25°C до -15°C	Чувајте го ладен.	Индексирање PCR

Табела 18 Кутија TruSight Oncology Comp Library Prep (за во фрижидер) (број на дел 20031119)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
SPB (светлозелена етикета)	2°C до 8°C	Оставете на собна температура 30 минути.	Чистење на лигацијата
RSB	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Чистење на лигацијата

Табела 19 Кутија TruSight Oncology Comp UP Index Primers (број на дел 20031120)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
UPxx	-25°C до -15°C	Одмрзнете ги соодветните епрувети со индексни прајмер на собна температура.	Индексирање PCR

Табела 20 Кутија TruSight Oncology Comp CP Index Primers (број на дел 20031126)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
CPxx	-25°C до -15°C	Одмрзнете ги соодветните епрувети со индексни прајмер на собна температура.	Индексирање PCR

Извршување поправка на краевите и А-додаток

Со помош на главната мешавина за End Repair A-Tailing (ERA1), со овој процес се поправаат продолжетоките, кои произлегуваат од фрагментација, при што се добиваат краеве со продолжен А-додаток.

Со 3' кон 5' егзонуклеазната активност на оваа мешавина се отстрануваат продолжетоките на 3', а со 5' кон 3' полимеразната активност се пополнуваат продолжетоките на 5'. При оваа реакција, краевите на 3' добиваат А-опашка за да се спречи нивна меѓусебна лигација за време на реакцијата за лигација на адаптери.

Подготовка

- Загрејте два инкубатори за микропримероци со топлотни блокови MIDI на следниот начин.
 - Загрејте инкубатор за микропримерок на 30 °C.
 - Загрејте инкубатор за микропримерок на 72 °C.
- Подгответе ги следните реагенси.
 - ERA1-A—Кратко центрифугирајте го, а потоа пипетирајте го за да се измеша. Чувајте го ладен.
 - ERA1-B—Измешајте го со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте го. Проверете дали има талог. Ако има, загрејте ја епруветата на 37 °C, а потоа пипетирајте го за да се измеша додека не се раствори талогот.
- Подгответе ја главната мешавина ERA1 во епрувета за микроцентрифугирање.

Табела 21 Главна мешавина за ERA1*

Компонента за главната мешавина	4 библиотечни материјали	8 библиотечни материјали	16 библиотечни материјали	24 библиотечни материјали	48 библиотечни материјали
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

* Во оваа табела е дадена прекумерната количина. Пресметките може да ги најдете во делот [Ракување со реагенси на страница 36](#).

4. Полека пипетирајте 10 пати за да добиете хомогеност, кратко центрифугирајте. Чувајте ја главната мешавина ERA1 студена.
5. Изберете една од следните опции за подготовка на плочата:
 - Ако примероците се на плоча MIDI, подгответе ги на следниот начин.
 - a. Повторно означете ја плочата MIDI со LP2 (подготовка на библиотечен материјал 2).
 - b. Ако некои примероци се наоѓаат во одделни плочи MIDI, преместете ги сите примероци во посебни бунарчиња од истата плоча MIDI, во согласност со распоредот на плочата.
 - Ако плочата е замрзната, подгответе се на следниот начин.
 - a. Одмрзнете ги плочата PCF PCR или плочата LP PCR на собна температура.
 - b. Центрифугирајте ја плочата 1 минута на 280 × g.
 - c. Пипетирајте 10 пати за да измешате.
 - d. Со LP2 (подготовка на библиотечен материјал 2) означете нова плоча MIDI со 96 бунарчиња.
 - e. Пренесете ги целите примероци од по 50 µl од плочата PCF PCR или плочата LP PCR во соодветното бунарче на плочата LP2 MIDI.
 - f. Фрлете ја плочата PCF PCR или плочата LP PCR.

Процедура

1. Додадете главна мешавина од 10 µl ERA1 во секое бунарче со примерок на плочата LP2 MIDI.
2. Фрлете ја преостанатата главна мешавина ERA1.
3. На плочата LP2 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
4. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
5. Инкубирајте во претходно загреан инкубатор за микропримероци 30 минути на 30°C.
6. Веднаш пренесете во втор, претходно загреан инкубатор за микропримерок.
7. Инкубирајте на температура од 72°C 20 минути.
8. Чувајте ја плочата LP2 MIDI студена 5 минути.

Лигација на адаптери

Во овој процес, адаптерите се лигираат на краевите од фрагментите cDNA и/или gDNA.

Анализата TSO Comprehensive (EU) ги вклучува адаптерите SUA1 и UMI.

- Со примероците РНК користете адаптери SUA1.
- Со примероците ДНК користете адаптери UMI.

Подготовка

1. Подгответе ги следните реагенси.

- ALB1—Мешајте со вортекс-мешалка најмалку 10 секунди, а потоа кратко центрифугирајте.
- LIG3—Кратко центрифугирајте, а потоа пипетирајте за да измешате. Чувајте го ладен.
- SUA1—Мешајте со вортекс-мешалка најмалку 10 секунди, а потоа кратко центрифугирајте.
- UMI—Мешајте со вортекс-мешалка најмалку 10 секунди, а потоа кратко центрифугирајте.
- STL—Оставете настрана за употреба во процедурата.

Процедура

1. Тргнете ја плочата за LP2 MIDI од мразот или еквивалентно.
2. Додајте 60 µl ALB1 во секое бунарче со примерок на плочата LP2 MIDI. ALB1 е вискозен раствор. Пипетирајте полека за да го минимизирате формирањето меурчиња.
3. Додајте 5 µl LIG3 во секое бунарче за примерок.
4. Додајте адаптери на следниот начин.
Не комбинирајте заедно различни типови адаптери.
 - **[Бунарчиња со примероци од РНК]**—Додајте 10 µl SUA1 (сино капаче) на секој библиотечен материјал добиен од РНК.
 - **[Бунарчиња со примероци од ДНК]**—Додајте 10 µl UMI (бело капаче) на секој библиотечен материјал добиен од ДНК.
5. На плочата LP2 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
6. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
7. Инкубирајте на собна температура 30 минути.
8. Измешајте ги STL со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
9. Додајте 5 µl STL во секое бунарче со примерок од плочата LP2 MIDI.
10. На плочата LP2 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
11. Протресете 2 минути на 1800 rpm.

Чистење на лигацијата

При овој процес, со помош на SPB се прочистуваат фрагментите cDNA или gDNA кои се лигирани со адаптер и се отстрануваат непожелните производи. Топчињата се измиваат двапати со свеж 80% етанол. Примероците лигирани со адаптер се елуираат со RSB.

Подготовка

1. Подгответе ги следните реагенси.
 - SPB—Пред употреба оставете ги топчињата на собна температура 30 минути.

- RSB— Оставете го настрана за употреба во процедурата.
2. Подгответе 80% свеж EtOH во конусна епрувета од 15 ml или од 50 ml.

Табела 22 Подготовка на 80% свеж етанол

Реагенс	4 библиотечни материјали	8 библиотечни материјали	16 библиотечни материјали	24 библиотечни материјали	48 библиотечни материјали
100% EtOH, чист	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. Измешајте 80% свеж EtOH со вортекс-мешалка.
4. Поставете го магнетот.

Процедура

Врзување

1. Мешајте ги SPB со вортекс-мешалка 1 минута за повторно да ги суспендирате топчињата.
2. Веднаш додајте 112 µl SPB во секое бунарче со примерок од плочата LP2 MIDI.
Ако користите коритце за дозирање на SPB, вклучете го факторот за прекумерност 1,15 кога аликвотирате доволно материјал по примерок. Откако ќе додадете SPB во секое бунарче со примерок, фрлете го материјалот што ќе ви преостане.
3. На плочата LP2 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
4. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
5. Инкубирајте на собна температура 5 минути.
6. Оставете ја плочата LP2 MIDI на магнетен држач 10 минути.
7. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче со примерок.

Испирање

1. Испирајте ги топчињата на следниот начин.
 - a. Оставете ја плочата LP2 MIDI на магнетниот држач и додајте 200 µl свеж 80% EtOH во секое бунарче со примерок.
 - b. Почекајте 30 секунди.
 - c. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче со примерок.
2. Исперете ги топчињата по **вторпат**.
3. Употребете пипета со тенки врвови за да го отстраните преостанатиот EtOH од секое бунарче.
4. Фрлете го неискористениот 80% EtOH.

Елуирање

1. Извадете ја плочата LP2 MIDI од магнетниот држач.
2. Превртете го или мешајте го RSB со вортекс-мешалка.
3. Додајте 27,5 µl RSB во секое бунарче за примерок.
4. На плочата LP2 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча. Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
5. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
6. Инкубирајте на собна температура 2 минути.
7. Оставете ја плочата LP2 MIDI на магнетен држач 2 минути.
8. Означете со LS (примероци библиотечен материјал) нова плоча MIDI со 96 бунарчиња.
9. Пренесете 25 µl од секој елуат од плочата LP2 MIDI во соодветното бунарче на плочата LS PCR.
10. Фрлете ја празната плоча LP2 MIDI.

Индексирање PCR

При овој чекор се амплифицираат фрагменти библиотечен материјал со помош на прајмери кои додаваат индексни секвенци за мултиплексирање на примерокот. Добиениот производ го содржи сиот библиотечен материјал од фрагментите cDNA и/или ДНК, опкружени со адаптери кои се потребни за генерирање кластери.

Подготовка

1. Подгответе ги следните реагенси.
 - EPM—Чувајте ги студени.
 - UPxx—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте. При поставувањето на обработката, UPxx се избира како индексен прајмер на екранот Create Run (Креирање обработка) во Local Run Manager софтверот.

- CPxx—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте. При поставувањето на обработката, UPxx се избира како индексен прајмер на екранот Create Run (Креирање обработка) во Local Run Manager софтверот.
2. Проверете дали индексите за секој примерок одговараат на планираното извршување во Модул за анализа TSO Comprehensive (EU) за време на поставувањето на обработката. При избирањето индекси, следете ги упатствата во делот [Број библиотечни материјали и избирање индекси на страница 38](#).

**ВНИМАНИЕ**

Несовпаѓањето меѓу примероците и индексните прајмери доведува до пријавување неточни резултати поради губењето позитивна идентификација на примерокот.

Процедура

1. Додајте 5 µl од соодветниот индексен прајмер (UPxx или CPxx) во соодветното бунарче со примерок на плочата за LS PCR во согласност со избраните индекси.

**ВНИМАНИЕ**

Отворете и работете само со по една епрувета индексен прајмер. По употребата, веднаш затворете ја епруветата со индекс со ново капаче. Не комбинирајте ги заедно индексните прајмери.

2. Мешајте го EPM со вортекс-мешалка 5 секунди, а потоа кратко центрифугирајте го.
3. Додајте 20 µl EPM во секое бунарче за примерок.
4. На плочата за LS PCR ставете леплив запечатувач за плоча. Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
5. Протресете 1 минута на 1200 rpm.
6. Реагенсите за предамплификација вратете ги на местото за складирање.

**ВНИМАНИЕ**

Извршете ги сите последователни чекори во просторот за постамплификација за да не дојде до пренесување на производот за амплификација.

7. Центрифугирајте ја плочата за LS PCR 1 минута на 280 × g.
8. Ставете ја на термоциклер со однапред програмирана постамплификација и стартувајте ја програмата за I-PCR.
Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
Ако продолжите со [Поставување прва хибридизација на страница 63](#), следете го упатството за одмрзнување реагенси во делот Подготовка за чекорите од протоколот.
9. Кога ќе заврши програмата I-PCR, центрифугирајте ја плочата за LS PCR 1 минута на 280 × g.
10. Повторно означете ја плочата со ALS (примероци амплифициран библиотечен материјал).

ТОЧКА ЗА БЕЗБЕДНО ЗАПИРАЊЕ

Ако запрете, плочата за ALS PCR чувајте ја на температура од -25°C до -15°C најмного до 30 дена.

Подготовка за протоколот

Оваа подготовка е потребна за извршување на протоколарните чекори што водат до хибридизација преку ноќ.

1. Проверете дали се поставени програмите за термоциклер за постаплификација. Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
2. Извадете ги епруветите со реагенси од кутијата и следете ги упатствата за одмрзнување.

Табела 23 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за во фрижидер) (број на дел 20031123)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
TCB1	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Поставување прва хибридизација

Табела 24 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за замрзнување) (број на дел 20031121)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
TCA1	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Поставување прва хибридизација

Табела 25 Кутија TruSight Oncology Comp Content Set (број на дел 20031122)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
OPR1 (црвено капаче)	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Поставување прва хибридизација
OPD2 (бело капаче)	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Поставување прва хибридизација

Поставување прва хибридизација

Во текот на овој процес, збир олигонуклеотиди се хибридира во библиотечни материјали на cDNA, а збир олигонуклеотиди се хибридира во библиотечни материјали на gDNA подготвени во [Индексирање PCR на страница 60](#). За збогатување на целните регии, потребни се два чекори на хибридизација. Во првата хибридизација, олигонуклеотидите преку ноќ (од 8 до 24 часа) се хибридираат во библиотечни материјали на cDNA и/или на gDNA.

Подготовка

1. Подгответе ги следните реагенси.

- TCB1—загревајте ја епруветата на температура од 37 °C, 5 минути. Мешајте со вортекс-мешалка 10 секунди, а потоа кратко центрифугирајте.
 - TCA1—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - OPR1—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - OPD2—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
2. Ако плочата ALS PCR била складирана, одмрзнете ја на собна температура и центрифугирајте ја 1 минута на 280 × g. Пипетирајте за да се измеша.
 3. Со HYB1 (хибридизација 1) означете нова плоча за PCR со 96 бунарчиња.

Процедура

1. Пренесете по 20 µl од секој од библиотечните материјали на cDNA и/или на gDNA од плочата за ALS PCR во соодветното бунарче во плочата за HYB1 PCR.
2. Ставете леплива заптивка за плоча на плочата за ALS PCR и тргнете ја настрана. Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
3. Проверете го TCB1 дали има талог. Ако има, повторно загрејте ја епруветата и мешајте ја со вортекс-мешалка, сè додека не се растворат кристалите.
4. Додадете 15 µl TCB1 во секое бунарче со библиотечен материјал од плочата за HYB1 PCR.
5. Додадете 10 µl TCA1 во секое бунарче со библиотечен материјал од плочата за HYB1 PCR.
6. Додајте сонди.
Не комбинирајте заедно различни типови сонди. На едно бунарче додајте само еден сет сонди.
 - **[Бунарчиња за библиотечен материјал на РНК]**—Додајте 5 µl OPR1 (црвено капаче) на секој библиотечен материјал добиен од РНК.
 - **[Бунарчиња за библиотечен материјал на ДНК]**—Додајте 5 µl OPD2 (бело капаче) на секој библиотечен материјал добиен од ДНК.
7. На плочата за HYB1 PCR ставете леплива заптивка за плоча. Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
8. Протресете 2 минути на 1200 rpm.
9. Ставете на термоциклер и стартувајте ја програмата за HYB1.
Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
10. Хибридизирајте на 57 °C најмалку 8, а најмногу 24 часа.
11. Реагенсите за хибридизација вратете ги на местото за складирање.
12. Плочата за ALS PCR чувајте ја на температура од -25 °C до -15 °C најмногу до 30 дена.

Подготовка за протоколот

Оваа подготовка е потребна за извршување на чекорите од протоколот што водат до следната безбедна точка за запирање.

На почетокот од вториот ден, извадете ги епруветите со реагенс од кутијата и следете ги упатствата за одмрзнување.

Табела 26 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за во фрижидер) (број на дел 20031123)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
SMB (темносива етикета)	2°C до 8°C	Оставете на собна температура 30 минути.	Снимање цели - прв дел Снимање цели - втор дел
ET2	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Снимање цели - прв дел Снимање цели - втор дел
HP3	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Снимање цели - прв дел Снимање цели - втор дел Нормализирање библиотечен материјал
TCB1	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Поставување втора хибридизација
RSB	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Снимање цели - втор дел Чистење амплифициран збогатен библиотечен материјал

Табела 27 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за замрзнување) (број на дел 20031121)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
EE2	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Снимање цели - прв дел Снимање цели - втор дел Нормализирање библиотечен материјал
EEW	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Снимање цели - прв дел
TCA1	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Поставување втора хибридизација

Табела 28 Кутија TruSight Oncology Comp Content Set (број на дел 20031122)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
OPR1 (црвено капаче)	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Поставување втора хибридизација
OPD2 (бело капаче)	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Поставување втора хибридизација

Снимање цели - прв дел

При овој чекор се користи SMB за да се снимат хибридризираните сонди во целните регии кои се предмет на интерес. Топчињата се измиваат три пати со EEW. Збогатениот библиотечен материјал се елуира со нова мешавина за елуирање EE2 + HP3 и се неутрализира со ET2.

Подготовка

1. Однапред загрејте инкубатор за микропримероци со топлински блок MIDI на 57 °C.
2. Подгответе ги следните реагенси.
 - EEW—Измешајте со вортекс-мешалка 1 минута.
 - EE2—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - HP3—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - SMB—Пред употреба оставете ги топчињата на собна температура 30 минути. За оваа процедура користете **SMB**, а не SPB.
 - ET2—Оставете го настрана за употреба во процедурата.
3. Подгответе нова мешавина за елуирање EE2 + HP3 во епрувета за микроцентрифугирање.

Табела 29 Мешавина за елуирање EE2 + HP3 за снимање цели – прв дел

Компонента за мешавина за елуирање	4 библиотечни материјали	8 библиотечни материјали	16 библиотечни материјали	24 библиотечни материјали	48 библиотечни материјали
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Во оваа табела е дадена прекумерната количина. Пресметките може да ги најдете во делот [Ракување со реагенси на страница 36](#).

4. Измешајте мешавина EE2 + HP3 за елуирање со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте. Одвојте за [Елуирање на страница 68](#) чекор.
5. Означете со CAP1 (снимање 1) нова плоча MIDI со 96 бунарчиња.
6. Поставете го магнетот.

Процедура

Врзување

1. Извадете ја плочата за HYB1 PCR од термоциклерот.
2. Центрифугирајте ја плочата за HYB1 PCR 1 минута на 280 × g.
3. Мешајте ги SMB со вортекс-мешалка 1 минута за повторно да ги суспендирате топчињата.

Доколку е присутен талог или пелет од перли, осигурајте се дека е достигнато собна температура, пипетирајте нагоре-надолу за да го ослободите пелетот, а потоа промешајте со вртење за да го ресуспендираате.

4. Веднаш додајте 150 µl SMB во секое бунарче со библиотечен материјал на плочата CAP1 MIDI. Ако користите пластично коритце за дозирање на SMB, не заборавате го факторот за прекумерност од 1,15 ако аликвотирате доволно материјал по примерок.
5. Откако ќе додадете SMB во секое бунарче со примерок, фрлете го материјалот што ќе ви преостане.
6. Поставете ја пипетата на 50 µl и сиот волумен од секој библиотечен материјал пренесете го од плочата за HYB1 PCR во соодветното бунарче на плочата CAP1 MIDI.
7. Фрлете ја празната плоча за HYB1 PCR.
8. На плочата CAP1 MIDI ставете леплива заптивка за плоча. Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
9. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
10. Инкубирајте во претходно загреан инкубатор за микропримероци 25 минути на 57°C.
11. Оставете ја плочата CAP1 MIDI на магнетен држач 2 минути.
12. Чувајте ја плочата на магнетниот држач. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче.



ВНИМАНИЕ

Веднаш преминете на следниот чекор ([Измијте на страница 68](#)). Пелетата со топчиња не смее да остане подолг временски период без присуство на течност.

Измијте

1. Испирајте ги топчињата на следниот начин.
 - a. Извадете ја плочата CAP1 MIDI од магнетниот држач.
 - b. Додајте 200 µl EEW во секое бунарче.
 - c. Употребете пипетата поставена на 150 µl и пипетирајте најмалку 10 пати за да измешате. Проверете дали сите топчиња се повторно суспендирани. Погрижете се да не останат пелети со топчиња така што целиот раствор со топчиња од бунарчето внимателно ќе го аспирирате во врвот. Визуелно проверете го дното на секое бунарче. Ако има пелета од топчиња, насочете го врвот од пипетата кон пелетата со топчиња за да ја извлечете пелетата при испирањето. Пелетата со топчиња треба да биде целосно потопена во раствор. Растворот треба да има темнокафеава боја и хомогена конзистенција.
 - d. На плочата CAP1 MIDI ставете леплива заптивка за плоча.
 - e. Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
 - f. Протресете 4 минути на 1800 rpm.
 - g. Инкубирајте во инкубатор за микропримероци 5 минути на 57 °C.
 - h. Оставете ја плочата CAP1 MIDI на магнетен држач 2 минути.
 - i. Чувајте ја плочата на магнетниот држач. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче.
2. Исперете ги топчињата по **вторпат**.
3. Исперете ги топчињата по **третпат**.
4. Употребете пипета со тенки врвови за да го отстраните преостанатиот EtOH од секое бунарче.

Елуирање

1. Извадете ја плочата за CAP1 MIDI од магнетниот држач.
2. Измешајте нова мешавина EE2 + HP3 за елуирање со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ја.
3. Внимателно додајте мешавина за елуирање од 17 µl EE2 + HP3 во секое бунарче со библиотечен материјал на плочата CAP1 MIDI.
4. Фрлете ја преостанатата мешавина за елуирање EE2 + HP3.
5. На плочата CAP1 MIDI ставете леплива заптивка за плоча. Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
6. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
7. Ставете ја на магнетен држач 2 минути.
8. Означете со ELU1 (елуирање 1) нова плоча за PCR со 96 бунарчиња.
9. Измешајте го ET2 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
10. Додајте 5 µl ET2 во секое бунарче со библиотечен материјал на новата плоча за ELU1 PCR.

- Внимателно пренесете 15 µl елуат од секое бунарче со библиотечен материјал на плочата CAP1 MIDI во соодветното бунарче на плочата за ELU1 PCR.
- Фрлете ја празната плоча CAP1 MIDI.
- На плочата за ELU1 PCR ставете леплива заптивка за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
- Протресете 2 минути на 1200 rpm.
- Вратете го EEW на местото за складирање.

Поставување втора хибридизација

При овој чекор по вторпат се врзуваат целните регии од збогатените библиотечни материјали cDNA и/или gDNA со сондите за снимање. Со втората хибридизација се осигурува висока специфичност на снимените регии. За да се осигури оптимално збогатување на библиотечниот материјал, чекорот за втора хибридизација извршете го на 57°C во времетраење од најмалку 1,5 час, а најмногу 4 часа.

Подготовка

- Подгответе ги следните реагенси.
 - TCB1—загревајте ја епруветата на температура од 37°C, 5 минути. Мешајте со вортекс-мешалка 10 секунди, а потоа кратко центрифугирајте.
 - TCA1—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - OPR1—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - OPD2—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.

Процедура

- Проверете го TCB1 дали има талог. Ако има, повторно загрејте ја епруветата и мешајте ја со вортекс-мешалка, сè додека не се растворат кристалите.
- Додајте 15 µl TCB1 во секое бунарче со библиотечен материјал на плочата за ELU1 PCR.
- Додајте 10 µl TCA1 во секое бунарче со библиотечен материјал.
- Додадете ја истата сонда што се користеше за време на првата хибридизација во секое бунарче. На едно бунарче додајте само еден сет сонди.
Не комбинирајте заедно различни типови сонди.
 - [Бунарчиња за библиотечен материјал на РНК]**—Додајте 5 µl OPR1 (црвено капаче) на секој библиотечен материјал добиен од РНК.
 - [Бунарчиња за библиотечен материјал на ДНК]**—Додајте 5 µl OPR2 (бело капаче) на секој библиотечен материјал добиен од ДНК.
- На плочата за ELU1 PCR ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.

6. Протресете 2 минути на 1200 rpm.
7. Ставете ја на термоциклер и стартувајте ја програмата HYB2.
Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
8. Хибридизирајте на 57°C најмалку 1,5 часа до најмногу 4 часа.
9. Реагенсите за хибридизација вратете ги на местото за складирање.

Снимање цели - втор дел

При овој чекор се користи SMB за да се снимат хибридизираните сонди во целните регии кои се предмет на интерес. Топчињата се измиваат еднаш со RSB. Збогатениот библиотечен материјал се елуира со нова мешавина за елуирање EE2 + HP3 и се неутрализира со ET2.

Подготовка

1. Претходно загрејте инкубатор за микропримероци со топлотен блок MIDI на 57 °C.
2. Подгответе ги следните реагенси.
 - EE2—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - HP3—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - SMB—Пред употреба оставете ги топчињата на собна температура 30 минути.
За оваа процедура користете **SMB**, а не SPB.
 - RSB—Оставете го настрана за употреба во процедурата.
 - ET2—Оставете го настрана за употреба во процедурата.
3. Подгответе нова мешавина за елуирање EE2 + HP3 во епрувета за микроцентрифугирање.

Табела 30 Мешавина за елуирање EE2 + HP3 за снимање цели – втор дел

Компонента за мешавина за елуирање	4 библиотечни материјали	8 библиотечни материјали	16 библиотечни материјали	24 библиотечни материјали	48 библиотечни материјали
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Во оваа табела е дадена прекумерната количина. Пресметките може да ги најдете во делот [Ракување со реагенси на страница 36](#).

4. Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте. Оставете ја настрана за [Елуирање на страница 72](#).
5. Означете со CAP2 (снимање 2) нова плоча MIDI со 96 бунарчиња.
6. Поставете го магнетот.

Процедура

Врзување

1. Извадете ја плочата за ELU1 PCR од термоциклерот.
2. Центрифугирајте ја плочата за ELU1 PCR 1 минута на 280 × g.
3. Мешајте ги SMB со вортекс-мешалка 1 минута за повторно да ги суспендирате топчињата.
Доколку е присутен талог или пелет од перли, осигурајте се дека е достигнато собна температура, пипетирајте нагоре-надолу за да го ослободите пелетот, а потоа промешајте со вртење за да го ресуспендирате.
4. Веднаш додајте 150 µl SMB во секое бунарче со библиотечен материјал на плочата CAP2 MIDI.
Ако користите пластично коритце за дозирање на SMB, не заборавате го факторот за прекумерност од 1,15 ако аликвотирате доволно материјал по примерок.
5. Откако ќе додадете SMB во секое бунарче со примерок, фрлете го материјалот што ќе ви преостане.
6. Поставете ја пипетата на 50 µl и сета количина од секој библиотечен материјал пренесете ја од плочата за ELU1 PCR во соодветното бунарче на плочата CAP2 MIDI.
7. Фрлете ја празната плоча за ELU1 PCR.
8. На плочата CAP2 MIDI ставете леплива заптивка за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
9. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
10. Инкубирајте во инкубатор за микропримероци 25 минути на 57 °C.
Ако продолжите со [Амплифицирање збогатен библиотечен материјал на страница 74](#), следете го упатството за одмрзнување реагенси во делот [Подготовка за протоколот](#).
11. Ставете ја на магнетен држач 2 минути.
12. Чувајте ја плочата CAP2 MIDI на магнетниот држач. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче.



ВНИМАНИЕ

Веднаш преминете на следниот чекор ([Измијте на страница 71](#)). Пелетата со топчиња не смее да остане подолг временски период без присуство на течност.

Измијте

1. Извадете ја плочата CAP2 MIDI од магнетниот држач.
2. Превртете го или мешајте го RSB со вортекс-мешалка.
3. Додајте 200 µl RSB во секој сад.
4. На плочата CAP2 MIDI ставете леплива заптивка за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.

5. Протресете 4 минути на 1800 rpm.
6. Оставете ја плочата на магнетен држач 2 минути.
7. Чувајте ја плочата на магнетниот држач. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче.
8. Употребете пипета со тенки врвови за да го отстраните преостанатиот EtOH од секое бунарче.

Елуирање

1. Извадете ја плочата CAP2 MIDI од магнетниот држач.
2. Измешајте нова мешавина EE2 + HP3 за елуирање со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ја.
3. Додајте мешавина за елуирање од 22 µl EE2 + HP3 во секое бунарче со библиотечен материјал на плочата CAP2 MIDI.
4. Фрлете ја преостанатата мешавина за елуирање EE2 + HP3.
5. На плочата CAP2 MIDI ставете леплива заптивка за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
6. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
7. Ставете ја на магнетен држач 2 минути.
8. Означете со ELU2 (елуирање 2) нова плоча за PCR со 96 бунарчиња.
9. Измешајте го ET2 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
10. Додајте 5 µl ET2 во секое бунарче со библиотечен материјал на новата плоча за ELU2 PCR .
11. Внимателно пренесете 20 µl елуат од секое бунарче со библиотечен материјал на плочата CAP2 MIDI во соодветното бунарче на плочата за ELU2 PCR.
12. Фрлете ја празната плоча CAP2 MIDI.
13. На плочата за ELU2 PCR ставете леплива заптивка за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
14. Протресете 2 минути на 1200 rpm.
15. Вратете ги SMB, EE2, HP3 и ET2 на местото за складирање.

ТОЧКА ЗА БЕЗБЕДНО ЗАПИРАЊЕ

Ако запрете, центрифугирајте ја плочата за ELU2 PCR на 280 × g 1 минута и чувајте ја на температура од -25 °C до -15 °C до 7 дена.

Подготовка за протоколот

Оваа подготовка е потребна за извршување на чекорите од протоколот што водат до следната безбедна точка за запирање.

1. Подгответе кофа со мраз или еквивалентно.
2. Извадете ги епруветите со реагенси од кутијата и следете ги упатствата за одмрзнување.

Табела 31 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за замрзнување) (број на дел 20031121)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
PPC3	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Амплифицирање збогатен библиотечен материјал
ERM	-25°C до -15°C	Чувајте го ладен.	Амплифицирање збогатен библиотечен материјал

Табела 32 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за во фрижидер) (број на дел 20031123)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
SPB (светлозелена етикета)	2°C до 8°C	Оставете на собна температура 30 минути.	Чистење амплифициран збогатен библиотечен материјал
RSB	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Чистење амплифициран збогатен библиотечен материјал Подготовка за секвенционирање

Амплифицирање збогатен библиотечен материјал

При овој чекор се користат прајмери за амплифицирање збогатен библиотечен материјал.

Подготовка

1. Ако плочата за ELU2 била складирана, одмрзнете ја на собна температура, па центрифугирајте ја 1 минута на 280 × g.

Процедура

1. Измешајте го PPC3 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте го.
2. Додајте 5 µl PPC3 во секое бунарче со библиотечен материјал на плочата за ELU2 PCR.
3. Мешајте го EPM со вортекс-мешалка 5 секунди, а потоа кратко центрифугирајте го.
4. Додајте 20 µl EPM во секое бунарче со библиотечен материјал.
5. На плочата за ELU2 PCR ставете леплива заптивка за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
6. Протресете 2 минути на 1200 rpm.
7. Ставете на термоциклер и стартувајте ја програмата EL-PCR.
Погледнете го делот [Програмирање термоциклери на страница 45](#).
Ако продолжите со [Нормализирање библиотечен материјал на страница 77](#), следете го упатството за одмрзнување реагенси во делот [Подготовка за протоколот](#).
8. Вратете ги PPC3 и EPM на местото за складирање.

Чистење амплифициран збогатен библиотечен материјал

При овој чекор, збогатениот библиотечен материјал се прочистува од непожелните компоненти на реакција со помош на SPB. Топчињата се измиваат двапати со свеж 80% етанол. Библиотечниот материјал се елуира со RSB.

Подготовка

1. Подгответе ги следните реагенси.
 - SPB—Пред употреба оставете ги топчињата на собна температура 30 минути. Погрижете се за оваа процедура да користите **SPB**, а не **SMB**.
 - RSB—Оставете го настрана за употреба во процедурата.
2. Подгответе 80% свеж етанол во конусна епрувета од 15 ml или 50 ml.

Табела 33 Подготовка на 80% свеж етанол

Реагенс	4 библиотечни материјали	8 библиотечни материјали	16 библиотечни материјали	24 библиотечни материјали	48 библиотечни материјали
100% EtOH, чист	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. Измешајте 80% свеж EtOH со вортекс-мешалка.
4. Означете со BIND2 нова плоча со 96 бунарчиња за MIDI (чистење на врзување).
5. Поставете го магнетот.

Процедура

Врзување

1. Извадете ја плочата за ELU2 PCR од термоциклерот.
2. Центрифугирајте ја плочата за ELU2 PCR 1 минута на 280 × g.
3. Мешајте ги SPB со вортекс-мешалка 1 минута за повторно да ги суспендирате топчињата.
4. Веднаш додајте 110 µl SPB во секое бунарче со библиотечен материјал на плочата за BIND2 MIDI.
5. Пренесете 50 µl од секој библиотечен материјал од плочата за ELU2 PCR во соодветното бунарче на плочата за BIND2 MIDI.
6. Фрлете ја празната плоча за ELU2 PCR.
7. На плочата за BIND2 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
8. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
9. Инкубирајте на собна температура 5 минути.
10. Оставете ја плочата за BIND2 MIDI на магнетен држач 5 минути.
11. Чувајте ја плочата на магнетниот држач. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче.

Испирање

1. Испирајте ги топчињата на следниот начин.
 - a. Оставете ја плочата за BIND2 MIDI врз магнетниот држач и додајте 200 µl свеж 80% EtOH во секое бунарче.
 - b. Почекајте 30 секунди.
 - c. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче.

- Исперете ги топчињата по **вторпат**.
- Употребете пипета со тенки врвови за да го отстраните преостанатиот EtOH од секое бунарче.
- Фрлете го неискористениот 80% EtOH.

Елуирање

- Извадете ја плочата за BIND2 MIDI од магнетниот држач.
- Превртете или измешајте со вортекс-мешалка за да го измешате RSB.
- Додајте 32 µl RSB во секое бунарче со библиотечен материјал.
- На плочата за BIND2 MIDI ставете леплив запечатувач за плоча. Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
- Протресете 2 минути на 1800 rpm.
- Инкубирајте на собна температура 2 минути.
- Ставете ја на магнетен држач 2 минути.
- Со PL (пречистен библиотечен материјал) означете нова плоча за PCR со 96 бунарчиња.
- Пренесете 30 µl од секој елуат од плочата за BIND2 PCR во соодветното бунарче на плочата за PL PCR.
- Фрлете ја празната плоча BIND2 MIDI.
- На плочата за PL PCR ставете леплива заптивка за плоча.
- Вратете ги SPB и RSB на местото за складирање.

ТОЧКА ЗА БЕЗБЕДНО ЗАПИРАЊЕ

Ако запрете, центрифугирајте ја плочата за PL PCR на 280 × g 1 минута и чувајте ја на температура од -25°C до -15°C до 30 дена.

Подготовка за протоколот

Оваа подготовка е потребна за извршување на чекорите од протоколот што водат до следната безбедна точка за запирање.

- Извадете ги епруветите со реагенси од кутијата и следете ги упатствата за одмрзнување.

Табела 34 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за замрзнување) (број на дел 20031121)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
LNA1	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Нормализирање библиотечен материјал
EE2	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура.	Нормализирање библиотечен материјал

Табела 35 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за во фрижидер) (број на дел 20031123)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
LNB1	2°C до 8°C	Оставете на собна температура 30 минути.	Нормализирање библиотечен материјал
HP3	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Нормализирање библиотечен материјал Подготовка за секвенционирање
LNW1	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Нормализирање библиотечен материјал
LNS1	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Нормализирање библиотечен материјал

2. Ако истиот ден продолжите со [Подготовка за секвенционирање на страница 81](#), следете го упатството за одмрзнување во делот [Подготовка за протоколот](#).

Нормализирање библиотечен материјал

Во овој процес се користи LNB1 плус адитиви (LNA1) за да се нормализира количината на секој библиотечен материјал за да се обезбеди подеднакво претставување на библиотечниот материјал во збирните библиотечни материјали. Топчињата се измиваат двапати со LNW1. Библиотечниот материјал се елуира со нова мешавина за елуирање EE2 + HP3 и се неутрализира со LNS1.

Подготовка

- Подгответе ги следните реагенси.
 - LNB1—Пред употреба оставете ги топчињата на собна температура 30 минути.
 - LNA1—Измешајте со вортекс-мешалка.
 - EE2—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - HP3—Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
 - LNW1—Измешајте со вортекс-мешалка. Оставете настрана за употреба во процедура.
 - LNS1—Измешајте со вортекс-мешалка. Оставете настрана за употреба во процедурата.
- Мешајте го LNB1 со вортекс-мешалка 1 минута за повторно да ги суспендирате топчињата. Превртете ја епруветата со LNB1 горе-долу, за да бидете сигурни дека сите топчиња се повторно суспендирани.
- Со помош на пипета поставена на 800 µl, пипетирајте ја LNB1 нагоре-надолу 10 пати за да се овозможи повторна суспензија.
- Веднаш подгответе нова главна мешавина LNA1 + LNB1 во конусна епрувета.

**ВНИМАНИЕ**

Целосно суспендирајте ја повторно пелетата со топчиња LNB1 на дното од епруветата, за да не дојде до нееднаква густина на кластери.

Табела 36 Главна мешавина LNA1 + LNB1*

Компонента за главната мешавина	4 библиотечни материјали	8 библиотечни материјали	16 библиотечни материјали	24 библиотечни материјали	48 библиотечни материјали
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Во оваа табела е дадена прекумерната количина. Пресметките може да ги најдете во делот [Ракување со реагенси на страница 36](#).

- Измешајте ја главната мешавина LNA1 + LNB1 со вортекс-мешалка. Одвојте за чекорот [Поврзување на страница 78](#).
- Подгответе нова мешавина за елуирање EE2 + HP3 во епрувета за микроцентрифугирање.

Табела 37 Мешавина за елуирање EE2 + HP3 за нормализирање библиотечен материјал*

Компонента за мешавина за елуирање	4 библиотечни материјали	8 библиотечни материјали	16 библиотечни материјали	24 библиотечни материјали	48 библиотечни материјали
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Во оваа табела е дадена прекумерната количина. Пресметките може да ги најдете во делот [Ракување со реагенси на страница 36](#).

- Измешајте нова мешавина за елуирање со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте. Одвојте за чекорот [Елуција на страница 79](#).
- Ако плочата PL PCR била складирана, одмрзнете ја на собна температура и центрифугирајте ја 1 минута на 280 × g. Пипетирајте за да се измеша.
- Означете со BBN (нормализација со топчиња) нова плоча MIDI со 96 бунарчиња.
- Поставете го магнетот.

Процедура**Поврзување**

- Измешајте ја главната мешавина LNA1 + LNB1 со вортекс-мешалка.
- Веднаш додајте 45 µl од главната мешавина LNA1 + LNB1 во секое бунарче со библиотечен материјал од плочата за BBN MIDI.
- Фрлете ја преостанатата главна мешавина LNA1 + LNB1.

4. Додајте 20 µl од секоја збирка од PL PCR-плочата во соодветното бунарче на BBN MIDI-плочата.
5. На плочата BBN MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
6. Протресете 30 минути на 1800 rpm.
7. Ставете леплива заптивка за плоча на плочата PL PCR и вратете ја во местото за складирање.
8. Оставете ја плочата BBN MIDI на магнетен држач 2 минути.
9. Чувајте ја плочата на магнетниот држач. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче.

Испирање

1. Испирајте ги топчињата на следниот начин.
 - a. Извадете ја плочата BBN MIDI од магнетниот држач.
 - b. Додајте 45 µl LNWI во секое бунарче со библиотечен материјал.
 - c. На плочата BBN MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
 - d. Протресете 5 минути на 1800 rpm.
 - e. Оставете ја плочата BBN MIDI на магнетен држач 2 минути.
 - f. Чувајте ја плочата на магнетниот држач. Без да ја мрдате пелетата со топчиња, употребете ја пипетата поставена на 200 µl за да го отстраните и фрлите сиот супернатант од секое бунарче.
2. Исперете ги топчињата по *вторпат*
3. Употребете пипета со тенки врвови за да го отстраните преостанатиот супернатант од секое бунарче.

Елуција

1. Извадете ја плочата BBN MIDI од магнетниот држач.
2. Измешајте нова мешавина EE2 + HP3 за елуирање со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ја.
3. Додајте раствор од 32 µl EE2 + HP3 во секое бунарче со библиотечен материјал на плочата за BBN MIDI.
4. Фрлете ја преостанатата мешавина за елуирање.
5. На плочата BBN MIDI ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
6. Протресете 2 минути на 1800 rpm.
7. Ставете ја на магнетен држач 2 минути.
8. Означете со NL (нормализиран библиотечен материјал) нова плоча за PCR со 96 бунарчиња.
9. Внимателно пренесете 30 µl елуат од секое бунарче со библиотечен материјал на плочата за BBN MIDI во соодветното бунарче на плочата за NL PCR.



ВНИМАНИЕ

Ако аспирирате топчиња во врвовите од пипетите, истурете ги назад на плочата од магнетниот држач и почекајте да се разбистри течноста (~ 2 минути) пред да преминете на следниот чекор од процедурата.

10. Фрлете ја празната плоча за BBN MIDI.
11. Измешајте го LNS1 во вортекс-мешалка.
12. Додајте 30 µl LNS1 во секое бунарче со библиотечен материјал во новата плоча за NL PCR .
13. Пипетирајте пет пати за да измешате.
14. На плочата за NL PCR ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
15. Вратете ги LNB1, LNA1, EE2, LNW1 и LNS1 на местото за складирање.

ТОЧКА ЗА БЕЗБЕДНО ЗАПИРАЊЕ

Ако запрете, центрифугирајте ја плочата за NL PCR на 280 × g 1 минута и чувајте ја на температура од -25°C до -15°C до 32 дена.

Подготовка за протоколот

Оваа подготовка е потребна за извршување на протоколарните чекори што водат до секвенционирање.

Подготовката за секвенционирање потрошен материјал од NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (број на дел 20028871) започнете ја најмалку еден час пред употребата.

1. Извадете го пуферот за разредување библиотечен материјал (HT1) од местото за складирање со температура од -25°C до -15°C. Одмрзнете на собна температура. По одмрзнувањето, чувајте на ладно.
2. Следете ги упатствата за подготовка во *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (бр. на документ 1000000009513) за другите потрошни материјали во комплетот.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)

3. Извадете ги епруветите со реагенси од кутијата и следете ги упатствата за одмрзнување.

Табела 38 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за замрзнување) (број на дел 20031121)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
Внатрешна контрола за PhiX (PX3 или PhiX)	-25°C до -15°C	Одмрзнете на собна температура. По одмрзнувањето, чувајте на ладно.	Подготовка за секвенционирање

Табела 39 Кутија TruSight Oncology Comp Enrichment (за во фрижидер) (број на дел 20031123)

Реагенс	Начин на чување	Упатство за одмрзнување	Чекор од протоколот
HP3	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Подготовка за секвенционирање
RSB (розова етикета)	2°C до 8°C	Оставете на собна температура.	Подготовка за секвенционирање

Подготовка за секвенционирање

Секое извршување за секвенцирање ДНК и РНК треба да содржи позитивна контрола и NTC. NTC за ДНК и РНК се секвенцираат повеќепати, според потребите, така што секое извршување ќе содржи NTC.

Секое извршување за ДНК и РНК содржи посебна позитивна контрола.

Подготовка

1. Прегледајте ги упатствата дадени во [Број библиотечни материјали и избирање индекси на страница 38](#).
2. Означете епрувета за микроцентрифугирање со dHP3 (разреден HP3).
3. Означете епрувета за микроцентрифугирање со dPhiX (разреден PhiX).
4. Однапред загрејте топлотен блок на температура од 96 °C за микроцентрифугирање епрувети.
5. Подгответе кофа со мраз или еквивалентно.

Разредување и денатурација на контролни PhiX Control

1. Измешајте го HP3 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
2. Комбинирајте ги следните количини во епруветата за микроцентрифугирање dHP3.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Измешајте го dHP3 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
4. Превртете го или мешајте го RSB со вортекс-мешалка.
5. Измешајте го контролниот примерок PhiX со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
6. Комбинирајте ги следните количини во епруветата за микроцентрифугирање dPhiX.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX control
7. Додајте 10 µl dHP3 во епруветата dPhiX.
8. Фрлете ја епруветата dHP3.
9. Измешајте ја епруветата dPhiX во вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
10. Инкубирајте го dPhiX на собна температура 5 минути за да се денатурира.
11. Измешајте го HT1 во вортекс-мешалка.
12. Веднаш додајте 980 µl претходно разладен HT1 во dPhiX.
13. Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
14. Чувајте го PhiX студен сè додека не го употребите за подготовка на вториот раствор.
Крајната концентрација е 20 pM dPhiX.
15. Вратете ги PhiX, HP3 и RSB на местото за складирање.

Групирање во збирки и денатурирање на библиотечните материјали за TSO Comprehensive (EU)

1. Ако плочата NL PCR била складирана, одмрзнете ја на собна температура и центрифугирајте 1 минута на 280 × g.

2. Со пипета со повеќе канали, поставена на 30 µl, полека измешајте го библиотечниот материјал на плочата NL PCR со пипетирање пет пати.

За секој библиотечен материјал користете нов врв за пипета.



ВНИМАНИЕ

За оптимални перформанси, добро измешајте го библиотечниот материјал.

3. Изберете една од следните опции за групирање во збирки, денатурација и разредување библиотечен материјал.
 - [Опција 1] Истовремено секвенционирајте ги библиотечните материјали добиени од примероци РНК и од примероци ДНК. Погледнете ја [Опција 1: Заедничка употреба на библиотечни материјали од ДНК и РНК на страница 83](#).
 - [Опција 2] Секвенционирање библиотечни материјали добиени само од примероци ДНК. Погледнете ја [Опција 2: Библиотечни материјали само од ДНК на страница 84](#).
 - [Опција 3] Секвенционирање библиотечни материјали добиени само од примероци РНК. Погледнете ја [Опција 3: Библиотечни материјали само од РНК на страница 85](#).

Опција 1: Заедничка употреба на библиотечни материјали од ДНК и РНК

1. Означете епрувета за микроцентрифугирање со PRL (Збирни библиотечни материјали од РНК).
2. Означете ја епруветата за микроцентрифугирање со PDL (збирни библиотечни материјали од ДНК).
3. Пренесете 10 µl од секој нормализиран библиотечен материјал РНК (cDNA) од плочата за NL во епруветата за PRL.
Не групирајте два библиотечни материјали со ист индексен прајмер.
4. Пренесете 10 µl од секој нормализиран библиотечен материјал ДНК од плочата за NL во епруветата за PDL.
Не групирајте два библиотечни материјали со ист индексен прајмер.
5. На плочата за NL PCR ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
6. Измешајте ги епруветите со PRL и PDL со вортекс-мешалка.
7. Кратко центрифугирајте ги епруветите со PRL и PDL.
8. Инкубирајте ги епруветите со PRL и PDL во топлотен блок 2 минути на 96°C.
9. Чувајте ги епруветите со PRL и PDL ладни 5 минути.
10. Измешајте ги епруветите со PRL и PDL со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ги.
11. Чувајте ги епруветите со PRL и PDL ладни.

Подготовка на прво разредување

1. Означете епрувета за микроцентрифугирање со DIL1 (разредување 1).
2. Пренесете 20 µl PDL во празната епрувета DIL1.

3. Додајте 5 µl PRL во епруветата DIL1.
4. Фрлете ги епруветите со PDL и PRL.
5. Во епруветата DIL1 додајте 475 µl претходно разладен HT1 (разредување 1:20).
6. Измешајте ја епруветата DIL1 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ја.

Подготовка на второ разредување

1. Означете епрувета за микроцентрифугирање од 2,0 ml со DIL2 (разредување 2).
2. Пренесете 40 µl од DIL1 во празната епрувета DIL2.
3. Фрлете ја епруветата DIL1.
4. Во епруветата DIL2 додајте 1660 µl претходно разладен HT1 (разредување 1:850).
5. Измешајте ги подготвените 20 pM dPhiX за мешање со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ги.
6. Во епруветата DIL2 додајте 2,5 µl подготвени 20 pM dPhiX.
7. Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
8. Ставете 1300 µl DIL2 во одмрзнатиот NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
Повеќе информации може да најдете во *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (бр. на документ 1000000009513).
9. Фрлете ја епруветата DIL2.
10. Центрифугирајте ја плочата за NL PCR 1 минута на 280 × g и потоа чувајте ја на температура од -25°C до -15°C до 32 дена.
11. Преминете на секвенционирање.
Повеќе информации може да најдете во *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (бр. на документ 1000000009513).

Опција 2: Библиотечни материјали само од ДНК

1. Означете ја епруветата за микроцентрифугирање со PDL (збирни библиотечни материјали од ДНК).
2. Пренесете по 10 µl од секој нормализиран ДНК-библиотечен материјал од NL-плочата во епруветата за PDL.
Не групирајте два библиотечни материјали со ист индексен прајмер.
3. На плочата за NL PCR ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно запечатете ги рабовите и бунарчињата.
4. Измешајте ја епруветата со PDL со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
5. Инкубирајте ја епруветата со PDL во топлотен блок 2 минути на 96°C.
6. Чувајте ја епруветата со PDL ладна 5 минути.
7. Измешајте ја епруветата со PDL со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
8. Чувајте ја епруветата со PDL ладна.

Подготовка на прво разредување

1. Означете епрувета за микроцентрифугирање со DIL1 (разредување 1).
2. Пренесете 10 µl PDL во празната епрувета DIL1.
3. Фрлете ја епруветата со PDL.
4. Во епруветата DIL1 додајте 190 µl претходно разладен HT1 (разредување 1:20).
5. Измешајте ја DIL1 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ја.

Подготовка на второ разредување

1. Означете епрувета за микроцентрифугирање од 2,0 ml со DIL2 (разредување 2).
2. Пренесете 40 µl од DIL1 во празната епрувета DIL2.
3. Фрлете ја епруветата DIL1.
4. Во епруветата DIL2 додајте 1660 µl претходно разладен HT1 (разредување 1:850).
5. Измешајте ги подготвените 20 pM dPhiX со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ги.
6. Во епруветата DIL2 додајте 2,5 µl подготвени 20 pM dPhiX.
7. Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
8. Ставете 1300 µl DIL2 во одмрзнатиот NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
Повеќе информации може да најдете во *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (бр. на документ 1000000009513).
9. Фрлете ја епруветата DIL2.
10. Центрифугирајте ја плочата за NL PCR 1 минута на 280 × g и потоа чувајте ја на температура од -25°C до -15°C до 32 дена.
11. Преминете на секвенционирање.
Повеќе информации може да најдете во *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (бр. на документ 1000000009513).

Опција 3: Библиотечни материјали само од РНК

1. Означете епрувета за микроцентрифугирање со PRL (Збирни библиотечни материјали од РНК).
2. Пренесете по 10 µl од секоја нормализирана РНК-збирка (комплементарна РНК) од NL-плочата во епруветата за PRL.
Не групирајте два библиотечни материјали со ист индексен прајмер.
3. На плочата за NL PCR ставете леплив запечатувач за плоча.
Целосно затворете ги рабовите и бунарчињата за да не дојде до испарување.
4. Измешајте ја епруветата со PRL со вортекс-мешалка.
5. Кратко центрифугирајте ја епруветата со PRL.
6. Инкубирајте ја епруветата со PRL во топлотен блок 2 минути на 96°C.

7. Чувајте ја епруветата со PRL ладна 5 минути.
8. Измешајте ја епруветата со PRL со вортекс-мешалка, а потоа центрифугирајте ја кратко.
9. Чувајте ја епруветата со PRL ладна.

Подготовка на прво разредување

1. Означете епрувета за микроцентрифугирање со DIL1 (разредување 1).
2. Пренесете 10 µl PRL во празната епрувета DIL1.
3. Фрлете ја епруветата со PRL.
4. Во епруветата DIL1 додајте 190 µl претходно разладен HT1 (разредување 1:20).
5. Измешајте ја DIL1 со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ја.

Подготовка на второ разредување

1. Означете епрувета за микроцентрифугирање од 2,0 ml со DIL2 (разредување 2).
2. Пренесете 40 µl од DIL1 во празната епрувета DIL2.
3. Фрлете ја епруветата DIL1.
4. Во епруветата DIL2 додајте 1646 µl претходно разладен HT1 (разредување 1:843).
5. Измешајте ги подготвените 20 pM dPhiX со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте ги.
6. Во епруветата DIL2 додајте 16,7 µl подготвени 20 pM dPhiX.
7. Измешајте со вортекс-мешалка, а потоа кратко центрифугирајте.
8. Ставете 1300 µl DIL2 во одмрзнатиот NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
Повеќе информации може да најдете во *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (бр. на документ 1000000009513).
9. Фрлете ја епруветата DIL2.
10. Центрифугирајте ја плочата за NL PCR 1 минута на 280 × g и чувајте ја на температура од -25°C до -15°C до 32 дена.
11. Преминете на секвенционирање.
Повеќе информации може да најдете во *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (бр. на документ 1000000009513).

Толкување на резултатите

Резултатите од секвенционирањето со анализата TSO Comprehensive (EU) се пријавуваат за секој примерок поединечно во извештај во PDF и извештај во JSON формат. На ниво на примерок се генерира и Извештај за мала длабочина (`LowDepthReport.tsv`).

На ниво на обработка се генерираат следните излезни датотеки:

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

Само варијантите кои ќе ја поминат контролата на квалитет се појавуваат во извештаите во PDF и JSON.

За детални информации за анализата, погледнете во *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide* (бр. на документ 200008661).

Резултати од придружната дијагностика

За секоја предвидена употреба на придружната дијагностика (CDx) има три можни резултати:

- **Позитивен**—Детектирани се варијанта или биомаркер и се класифицирани како ниво 1 (CDx).
- **Не е детектирано**—Во примерокот не се детектирани варијанти или биомаркери кои се однесуваат на предвидената употреба на CDx. Типот тумор избран за примерокот е соодветен за CDx.
- **Нема резултат**—Не е можно да се утврди статусот на варијантата поради една или повеќе од следните причини:
 - Предвидената употреба на CDx не може да се примени на примерокот што се испитува бидејќи типот тумор избран за примерокот не е соодветен со типот тумор за CDx.
 - Обработката со секвенционирање не ги исполнила спецификациите за контрола на квалитет.
 - Библиотечниот материјал не ги исполнил задолжителните спецификации за контрола на квалитет.
 - Не е обработена соодветната нуклеинска киселина.

Сите резултати од предвидената употреба на CDx се пријавуваат во делот Резултати од придружната дијагностика во извештајот во JSON. Само предвидените употреби со позитивен резултат се наведуваат во делот Резултати од придружната дијагностика во извештајот во PDF.

Варијанти за профилирање тумори

TSO Comprehensive (EU) е изработен да пријави соматски варијанти кога пријавува варијанти со доказ дека имаат клиничко значење или варијанти со потенцијално клиничко значење. Софтверот за анализата TSO Comprehensive (EU) ја користи KB со што се утврдува дали секоја детектирана и подобна варијанта (Табела 2) е клинички значајна или потенцијално клинички значајна врз основа на терапевтските,

дијагностичките или прогностичките докази. КВ исто така зема предвид дали се утврдени (или не) поврзаности со типот тумор што се испитува. Подложноста или, пак, ризиците поврзани со ракот не се дел од КВ. Се отстрануваат вообичаените полиморфизми.

За варијантите за профилирање тумори, позитивните резултати се класифицираат во Геномски наоди со доказ од клиничко значење (Ниво 2) или геномски наоди со потенцијално клиничко значење (Ниво 3) во согласност со инсталираната КВ и идентификуваниот тип тумор.

Ако контролата на квалитет е неуспешна, нема да има резултати за типовите варијанти кои се релевантни за мерниот показател за контрола на квалитет кој не бил успешен. Погледнете ги [Табела 40](#) и [Табела 41](#) за повеќе информации. Позициите за профилирање тумори со недоволна длабочина се наведени во извештајот за мала длабочина, а не во извештајот за TSO Comprehensive (EU).

Контрола на квалитет

- Информациите за квантификација на нуклеинската киселина и минималните барања за внес на материјал, можете да ги најдете во делот [Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29](#).
- Обработката со секвенционирање и валидноста на примерокот се одредуваат автоматски и се пријавуваат со помош на Модул за анализа TSO Comprehensive (EU). За детални информации за анализата, погледнете во *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide* (бр. на документ 200008661).
- Во извештајот за TSO Comprehensive (EU), кој е достапен и во PDF и во JSON, се резимирани резултатите од контролата на квалитетот. Датотеките со извештаите се наоѓаат во папката за анализи. Погледнете во *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide* (бр. на документ 200008661) за локацијата на папката за анализа (содржи извештаи во PDF и JSON) и папката за обработки.

Табела 40 TSO Comprehensive (EU) Мерни показатели за контрола на квалитет на резултатите од извештајот

Тип излезна информација	Мерен показател	Спецификација	Опис	Влијание на неуспешна спецификација*
Обработка со секвенционирање	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Процент на отчитувања кои го поминуваат филтерот (PF).	Обработката на секвенционирањето е невалидна. Нема пријавени резултати за ниеден примерок од обработката.

Тип излезна информација	Мерен показател	Спецификација	Опис	Влијание на неуспешна спецификација*
	PCT_Q30_R1 (%)	$\geq 80,0$	Просечен процент на одредување бази чија оценка за квалитет е Q30 или повисока за Отчитувањето 1.	Обработката на секвенционирањето е невалидна. Нема пријавени резултати за ниеден примерок од обработката.
	PCT_Q30_R2 (%)	$\geq 80,0$	Просечен процент на одредување бази чија оценка за квалитет е Q30 или повисока за Отчитувањето 2.	

Тип излезна информација	Мерен показател	Спецификација	Опис	Влијание на неуспешна спецификација*
Библиотечен материјал на ДНК	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 ИЛИ > 3106 и $P_VALUE \leq 0,049$	Мерен показател со кој се проценува веројатноста за контаминација со помош на VAF на вообичаените варијанти. Оценката за контаминација се заснова на дистрибуцијата на VAF за SNP. Вредноста на контаминација P се користи за проценка на високо преуредени геноми. Применливо е само кога резултатот од контаминација е над горната специфицирана граница.	Не се пријавени резултати за ДНК.

Тип излезна информација	Мерен показател	Спецификација	Опис	Влијание на неуспешна спецификација*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Медијална должина на фрагмент во примерокот.	Не се пријавени резултати за TMB или за мали варијанти ДНК.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (број)	≥ 150	Медијална покриеност на фрагмент на егзон во сите бази на егзон.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Процент на бази на егзон со покриеност на фрагмент од 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (број)	≥ 40	Бројот на локации на MSI кои може да се користат за одредување на MSI (бројот на локации на микросателити со доволен опсег на отчитувања за да може да се идентификува нестабилноста на микросателитот).	Не се пријавени резултати за MSI.

Тип излезна информација	Мерен показател	Спецификација	Опис	Влијание на неуспешна спецификација*
	COVERAGE_MAD (број)	$\leq 0,210$	Медијана на апсолутни отстапувања од медијаната на нормализираниот број за секоја целна регија CNV.	Не се пријавени резултати за амплификација на гени.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (count)	$\geq 1,0$	Средна вредност на суров bin-број по цел за CNV.	
Библиотечен материјал на РНК	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Медијална должина на фрагмент во примерокот.	Не се пријавени резултати за фузии или сплајс варијанти.

Тип излезна информација	Мерен показател	Спецификација	Опис	Влијание на неуспешна спецификација*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (коефициент)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X е мерка за подеднаквост во покриеноста. За секој ген со покриеност од најмалку 500x, се пресметува коефициентот на варијацијата во покриеноста долж телото на генот. Овој мерен показател е медијана на овие вредности. Висока вредност укажува на високо ниво на варијација и на проблем во подготовката на библиотечен материјал, како на пример низок внес на примерок и/или проблеми со повлекување на сондите. Овој мерен показател се пресметува со помош на сите отчитувања (вклучувајќи ги и отчитувањата кои се означени како дупликати).	

Тип излезна информација	Мерен показател	Спецификација	Опис	Влијание на неуспешна спецификација*
	TOTAL_ON_TARGET_READS (број)	$\geq 9.000.000$	Вкупен број отчитувања кои ги мапираат целните регии. Овој мерен показател се пресметува со помош на сите отчитувања (вклучувајќи ги и отчитувањата кои се означени како дупликати).	

*Ако резултатите се успешни, се прикажува PASS (успешно).

Табела 41 TSO Comprehensive (EU) Мерни показатели за контрола на резултатите од извештајот

Тип излезна информација	Мерен показател	Спецификација	Влијание на неуспешна спецификација*
Позитивен контролен примерок	Надворешна контрола на ДНК	Детектирани се 23 од вкупно 24 назначени варијанти	Според резултатите од контролните примероци, рачно поништете ги примероците од пациентот. Софтверот за модулот за анализа не ги поништува автоматски примероците од пациентот според резултатите од контролните примероци.
	Надворешна контрола на РНК	Детектирани се 12 од вкупно 13 назначени варијанти.	
Контролен примерок без шаблон	Средна покриеност на егзонот на ДНК за TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Според резултатите од контролните примероци, рачно поништете ги примероците од пациентот. Софтверот за модулот за анализа не ги поништува автоматски примероците од пациентот според резултатите од контролните примероци.
	РНК ген над граничната вредност за медијаната	≤ 1	

*Ако резултатите се успешни, се прикажува PASS (успешно).

- Повторете ги невалидните обработки со секвенционирање.
- Повторете ги испитувањата на библиотечните материјали со следните резултати:

- Контаминирани библиотечни материјали на ДНК
- Невалидни библиотечни материјали на РНК
- Испитувањата може да се повторат за да се добијат повеќе резултати за варијантите или биомаркерите за библиотечните материјали на ДНК кои биле поништени за еден, но не за сите типови варијанти.
- Позитивните контролни примероци се евалуираат за одредувањето варијанти. Ако позитивните контролни примероци не ги исполнуваат спецификациите за одредување варијанти, тогаш рачно поништете ја обработката со секвенционирање. Софтверот за модулот за анализа не ги поништува автоматски примероците од пациентот според резултатите од контролните примероци.
- Се врши евалуација на NTC во однос на средната покриеност на егзон за ДНК и гените над средната гранична вредност за РНК. Ако негативните контролни примероци не ги исполнуваат спецификациите, рачно поништете ја подготовката на библиотечен материјал како и сите обработки со секвенционирање кои се однесуваат на неа. Софтверот за модулот за анализа не ги поништува автоматски примероците од пациентот според резултатите од контролните примероци.
- Спроведете дополнителни мерки за контрола на квалитетот во согласност со локалните, државните и/или федералните прописи или барањата за акредитација.

Повеќе информации за повторување на обработките со секвенционирање или испитувањата библиотечни материјали може да најдете во делот [Решавање проблеми на страница 96](#).

Решавање проблеми

Користете ја следната табела за да ги решите проблемите кои ќе се јават во текот на работата. Доколку една обработка со секвенционирање или пак подготовка библиотечен материјал двапати не успеат, потребен е дополнителен начин за да се реши проблемот. Контактирајте со техничката поддршка Illumina.

Забележан проблем	Можна причина	Препорачано решение
Обработката со секвенционирање не ги поминала спецификациите за контрола на квалитетот.	- Грешка при групирањето - Грешка при разредувањето - Нецелосна топлинска денатурација на PRL/PDL - Проблеми со подготовката на потрошен материјал за секвенционирање (на пример, неодмрзнат соодветно, кондензација/остатоци на проточната клетка)	Повторно секвенционирајте го библиотечниот материјал од плочата за PCR за нормализиран библиотечен материјал (Normalized Libraries)(NL). Погледнете го делот Подготовка за секвенционирање на страница 81.
	- Неправилна употреба на сонди за збогатување (на пример, сонди OPR1 што се користат за примероци на ДНК, сонди OPD2 што се користат за примероци на РНК) - Грешка во работниот тек при подготовката на библиотечниот материјал за време или по првиот чекор за хибридизација.	Повторете ги чекорите за збогатување за библиотечниот материјал од плочата за PCR за примероци амплифициран библиотечен материјал (Amplified Libraries Samples) (ALS). Погледнете го делот Поставување прва хибридизација на страница 63.

Забележан проблем	Можна причина	Препорачано решение
Грешка при генерирање на извештај или општа грешка на инструментот (грешка кај мрежата, грешки при полнење/празнење на реагенси итн.).	Не се исполнети барањата за внес на примерок	Започнете со подготовка на библиотечниот материјал од почетокот на работниот тек. Погледнете го делот Денатурација и рекомбинација на РНК во двоверижна форма на страница 47 или Фрагментирање gDNA на страница 52 .
	Грешка во работниот тек при подготовката на библиотечниот материјал за време или пред чекорот за индексирање на PCR	Повторете ги чекорите за збогатување на библиотечниот материјал од плочата за PCR за примероци амплифициран библиотечен материјал (Amplified Libraries Samples) (ALS). Погледнете го делот Поставување прва хибридизација на страница 63 .
	Проблем со инструментот	Контактирајте со техничката поддршка Illumina.
	Проблем со инструментот или софтверот.	Погледнете во Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (бр. на документ 200008661) за помош при генерирање извештаи. Контактирајте ја техничката поддршка на Illumina за дополнителна помош.
Библиотечниот материјал на ДНК не ги поминал спецификациите за контрола на квалитетот.	Не се исполнети барањата за внес на примерок.	Осигурете дека внесот на примерокот е соодветен и повторете ја подготовката на библиотечен материјал од чекорот за фрагментација на gDNA. Погледнете го делот Барања за примерокот на страница 28 и Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29 .

Забележан проблем	Можна причина	Препорачано решение
	Грешка во употребата или опремата при процесот за анализа.	Повторете го подготвувањето библиотечен материјал од еден од следните чекори, во зависност од тоа каде сметате дека се појавила потенцијалната грешка при употребата или кај лабораториската опрема. Доколку не е познато, или се појавиле други грешки, контактирајте ја техничката поддршка на Illumina за да го решите проблемот со обработката. • Повторно секвенционирајте го библиотечниот материјал од плочата за PCR за нормализиран библиотечен материјал (Normalized Libraries)(NL). Погледнете го делот Подготовка за секвенционирање на страница 81. • Повторно збогатете го библиотечниот материјал од плочата за PCR за примероци амплифициран библиотечен материјал (Amplified Libraries Samples) (ALS). Погледнете го делот Поставување прва хибридизација на страница 63. • Започнете со подготовка на библиотечниот материјал од почетокот на работниот тек. Погледнете го делот Фрагментирање gDNA на страница 52.

Забележан проблем	Можна причина	Препорачано решение
	Не се исполнети критериумите за CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE.	Прочитајте ги повторно предупредувањата и мерките за претпазливост за тоа како да не дојде до вкрстена контаминација. Ревидирајте ги распоредот на плочите и индексирањето библиотечен материјал за да сте сигурни дека библиотечни материјали со ист индекс не се секвенционираат заедно. Во однос на погодениот библиотечен материјал, започнете со подготовка на библиотечниот материјал од почетокот на работниот тек. Погледнете го делот Фрагментирање gDNA на страница 52. При екстракција на примерокот можеби дошло до контаминација. Можеби ќе треба да ја повторите екстракцијата за да бидете сигурни дека примерокот не е контаминиран.
	MSI која може да се употреби е неуспешна.	Ревидирајте ги поставките од производителот за ултразвучниот апарат кои се однесуваат на употребата и работењето (вклучително и нивото на вода и типот епрувета). Проверете дали има соодветен внес на примерок во анализата. Погледнете го делот Барања за примерокот на страница 28 и Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29. Можеби ќе треба да извршите нова екстракција на примерок и/или да го повторите чекорот за фрагментација на gDNA доколку примерокот е прекумерно фрагментиран или оштетен.

Забележан проблем	Можна причина	Препорачано решение
	Примерокот е прекумерно фрагментиран или пак има оштетувања на нуклеинската киселина, што би влијаело врз можноста да се генерираат доволен број уникатни библиотечни материјали.	Прегледајте ги Поставки за конфигурација на ултразвучен апарат за фрагментација на ДНК на страница 24 и поставките на производителот на ултразвучниот апарат за употребата и работата (што ги вклучува нивото на водата и типот на епрувета). Проверете дали има соодветен внес на примерок во анализата. Погледнете го делот Барања за примерокот на страница 28 и Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29 . Можеби ќе треба да извршите нова екстракција на примерок и/или да го повторите чекорот за фрагментација на gDNA доколку примерокот е прекумерно фрагментиран или оштетен.
Библиотечниот материјал на РНК не ги поминал спецификациите за контрола на квалитетот.	Не се исполнети барањата за внес на примерок.	Проверете дали внесот на примерокот е соодветен и повторете ја подготовката на библиотечен материјал од чекорот за денатурација и рекомбинација на РНК. Погледнете го делот Барања за примерокот на страница 28 и Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29 .

Забележан проблем	Можна причина	Препорачано решение
	Грешка во употребата или опремата при процесот за анализа.	Повторете го подготвувањето библиотечен материјал од еден од следните чекори, во зависност од тоа каде сметате дека се појавила потенцијалната грешка при употребата или кај лабораториската опрема. Доколку не е познато, или се појавиле други грешки, контактирајте ја техничката поддршка на Illumina за да го решите проблемот со обработката. • Повторно секвенционирајте го библиотечниот материјал од плочата за PCR за нормализиран библиотечен материјал (Normalized Libraries)(NL). Погледнете го делот Подготовка за секвенционирање на страница 81. • Повторете ги чекорите за збогатување на библиотечниот материјал од плочата за PCR за примероци амплифициран библиотечен материјал (Amplified Libraries Samples) (ALS). Погледнете го делот Поставување прва хибридизација на страница 63. • Започнете со подготовка на библиотечниот материјал од почетокот на работниот тек. Погледнете го делот Денатурација и рекомбинација на РНК во двоверижна форма на страница 47.
	Примерокот може да е прекумерно фрагментиран или пак да има оштетувања на нуклеинската киселина, што би влијаело врз можноста да се генерираат доволен број уникатни библиотечни материјали.	Погрижете се да има соодветен внес на примерок. Погледнете го делот Барања за примерокот на страница 28 и Екстракција, квантификација и чување нуклеинска киселина на страница 29. Можеби ќе треба да извршите нова екстракција доколку примерокот е прекумерно фрагментиран или оштетен.

Забележан проблем	Можна причина	Препорачано решение
Неуспешен позитивен контролен примерок (ДНК/РНК).	Не беа исполнети барањата за внес на примерок за позитивен контролен примерок.	Погрижете се внесот во анализата да биде соодветен. Ревидирајте го распоредот на плочите и проверете дали соодветните реагенси (сонди, индекси) се наоѓаат во соодветните бунарчиња. Позитивниот контролен примерок треба да се чува во согласност со етикетата. За сите примероци за кои е заеднички позитивниот контролен примерок, повторете го подготвувањето библиотечен материјал од еден од следните чекори, во зависност од тоа каде сметате дека се појавила потенцијалната грешка при употребата или кај опремата. Доколку не е познато, или се појавиле други грешки, контактирајте ја техничката поддршка на Illumina за да го решите проблемот со обработката. - Повторно секвенционирајте го библиотечниот материјал од плочата за PCR за нормализиран библиотечен материјал (Normalized Libraries)(NL). Погледнете го делот Подготовка за секвенционирање на страница 81. - Повторно збогатете го библиотечниот материјал од плочата за PCR за примероци амплифициран библиотечен материјал (Amplified Libraries Samples) (ALS). Погледнете го делот Поставување прва хибридизација на страница 63. - Започнете со подготовка на библиотечниот материјал од почетокот на работниот тек. Погледнете го делот Денатурација и рекомбинација на РНК во двоверижна форма на страница 47 или Фрагментирање gDNA на страница 52.
	Грешка во употребата или опремата при процесот за анализа.	

Забележан проблем	Можна причина	Препорачано решение
Неуспешен NTC (ДНК/РНК).	Дошло до вкрстена контаминација или пак контаминација на работната зона.	Прочитајте ги повторно предупредувањата и мерките за претпазливост за тоа како да ги деконтаминирате работните зони и да избегнете вкрстена контаминација. Ревидирајте ги распоредот на плочите и индексирањето библиотечен материјал за да сте сигурни дека библиотечни материјали со ист индекс не се секвенционираат заедно. Повторете ја подготовката на библиотечен материјал од почетокот на работниот тек за сите библиотечни материјали кои го делат контролниот примерок без шаблон.
	Неточно индексирање на библиотечниот материјал.	
Софтверот укажува дека позитивните и/или негативните контролни примероци не биле вклучени во обработката со секвенционирање.	Неправилно назначување на типот канцер при планирањето на обработката со Local Run Manager.	Повторно подредете ја анализата при што контролните примероци ќе бидат правилно идентификувани како што е наведено во Водичот за работниот тек за модулот за анализа (погледнете во <i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide</i> (бр. на документ 200008661)).

Карактеристики на перформансите

TSO Comprehensive (EU) е целен NGS панел кој детектира промени во 517 гени. Малите варијанти ДНК (варијанти со еден нуклеотид [SNV], варијанти со повеќе нуклеотиди [MNV], инсерции и бришења) се подобни за пријавување од сите 517 гени. Оптоварувањето на туморските мутации се прикажува како резултат базиран на бројот на соматски варијанти што не се двигатели според мегабаза (видете *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide* (бр. на документ 200008661) за детали). MSI е пријавено како статус. Амплификациите на гени се подобни за пријавување од гените MET и ERBB2. Фузиите се подобни за пријавување од 23-те гени наведени во [Резиме и објаснување на анализата на страница 1](#). Сплајс варијантите се подобни за пријавување од гените MET и EGFR. За да се пријават, варијантите мора да се детектирани, за нив да постои доказ во KB на анализата TSO Comprehensive (EU) и да се подобни според испитаниот тип ткиво. За да може да се пријават, фузискиот партнер на фузиите NTRK треба да биде 5', а доменот за NTRK киназа да биде интактен.

За мали варијанти ДНК беше спроведен репрезентативен пристап за валидација на целните гени во панелот, при што податоците ги претставуваа SNV, MNV, инсерции и делеции. За амплификациите на гени, фузиите и сплајс варијантите, испитувањето беше спроведено на ниво на гени. Онаму каде што имаше индикација, беа евалуирани TMB и MSI. За тврдењата од CDx за фузиите NTRK, фузиите во

примероците FFPE беа испитани во студии чиј фокус беа перформансите кои се однесуваа на тоа тврдење (како што се граница на детекција, внатрешно-лабораториска прецизност, повторливост, точност и клинички перформанси).

Во Табела 42 се дадени дефиниции за мерните показатели пресметани во различни студии.

Табела 42 Дефиниции за мерни показатели

Поим	Дефиниција
Процент позитивна усогласеност (PPA)	Процентот позитивни точно идентификувани резултати од вкупниот број позитивни резултати во однос на ортогоналниот метод.
Процент негативна усогласеност (PPA)	Процентот негативни точно идентификувани резултати од вкупниот број негативни резултати во однос на ортогоналниот метод.
Процент севкупна усогласеност (OPA)	Процентот позитивни и негативни точно идентификувани резултати од вкупниот број опсервации во однос на ортогоналниот метод.
Процент позитивни одредувања (PPC)	Процентот опсервации кои се позитивни за цел меѓу опсервациите кои се очекува да бидат позитивни за целта.
Процент негативни одредувања (PNC)	Процентот опсервации кои се негативни за цел меѓу опсервациите кои се очекува да бидат негативни за целта.
n/N	Бројот на позитивни или негативни набљудувања (n) поделен со вкупните набљудувања (N) за да се пресмета PPC или PNC, соодветно. Вредностите на n и N може да бидат на различни нивоа (на пр., варијанта или ген) или комбинирани низ група (на пр., SNV).
Стандардно отстапување (SD)	Мерка за количината на варијација на вредностите на променливата околу нејзината средна вредност.
Процент на коефициент на варијација (%CV)	Стандардна девијација поделена со средната вредност како процент.

Вкрстена контаминација

Беше спроведена студија за вкрстена контаминација за да се евалуира дали лажно позитивните резултати се резултат на контаминација помеѓу бунарчињата при подготовка на библиотечниот материјал или контаминација од една до друга обработка помеѓу последователни обработки со секвенционирање. Оваа анализа беше направена за мали варијанти на ДНК (кои исто така влијаат врз TMB), фузии, амплификации на гени и MSI. Библиотечните материјали беа подготвени од карактеризирани примероци поставени како шаховска табла со наизменични примероци за да се направи евалуација на контаминацијата од едно до друго бунарче и со наизменични индекси за да се направи евалуација на контаминацијата од една до друга обработка кога се секвенционираат последователно на истиот Инструмент NextSeq 550Dx. Студијата за вкрстена контаминација покажа нула случаи на контаминација при испитување на детектираните варијанти во секој примерок, без да бидат детектирани лажно позитивни резултати.

За анализата TSO Comprehensive (EU) беа дизајнирани два мерни показатели за контрола на квалитетот (CONTAMINATION_SCORE и P_VALUE) за да се открие контаминација на примерокот во примероците ДНК. Направена беше евалуација на чувствителноста за откривање контаминација. Примероците ДНК од FFPE тумор беа измешани со различни количества нормален примероци ДНК FFPE за да се создадат намерно контаминирани примероци.

Генерирани се вкупно 1112 опсервирани контаминација, а контаминација е детектирана кај 95 % (1054) од опсервираните случаи. Стапката на детекција беше зголемена на 96 % (939/976) кога процентот на контаминација беше помеѓу 10% и 90% (маса/маса). Од 37 опсервирани случаи со контаминација помеѓу 10% и 90% каде што не беше детектирана контаминација, 12 не ја исполнуваа спецификацијата за покриеност за да бидат одредени како мали варијанти на ДНК. Ниската покриеност го попречува откривањето на контаминација, но не се пријавени мали варијанти на ДНК кои го ублажуваат ефектот на контаминација. Во петнаесет опсервирани случаи не била исполнета спецификацијата за амплификација на гени (мерни показатели за контрола на квалитетот за средната вредност на bin-број) за да бидат одредени како амплификации на гени. Не се пријавени резултати за амплификација на гени за примероците.

Студијата покажа дека со анализата TSO Comprehensive (EU) се очекува да има ниска појава на вкрстена контаминација од едно до друго бунарче или од една до друга обработка. Овие резултати заедно со мерните показатели за контаминација во софтверот го ублажуваат ризикот од лажни резултати за варијанти поради контаминација на примерокот.

Евалуација на комплетот за екстракција на нуклеинска киселина

Со TSO Comprehensive (EU) беа евалуирани три комерцијални комплети за екстракција на РНК и ДНК. Со трите комплети за екстракција се изолираа и ДНК и РНК од истите делови од ткиво FFPE. Комплетите се

разликуваа според средството за депарафинизација и чекорите за врзување на нуклеинската киселина (Табела 43). Комплетот 1 преовладуваше како комплет за екстракција и се користеше за да се утврдат перформансите на TSO Comprehensive (EU).

Табела 43 Карактеристики на комплетот

Комплет	Средство за депарафинизација	Врзување на нуклеинска киселина
1	Сопствено	Колона
2	Ксилен	Колона
3	Минерално масло	Магнетни топчиња

Во Табела 44 и во Табела 45 се резимирани ефектите на комплетите за екстракција врз валидноста на библиотечниот материјал и одредувањето варијанти. Ако средните вредности на комплетот за екстракција значително се разликуваа, се пријавуваше разликата. Просечните разлики помеѓу комплетите за екстракција беа пресметани со комплетот 1 како контрола, бидејќи комплетот 1 беше користен за екстракција на повеќето нуклеински киселини користени за аналитичките студии TSO Comprehensive (EU). Беше пријавена средната разлика во однос на комплетот 1 за да се илустрира како различните комплети за екстракција ќе влијаат врз другите аналитички студии TSO Comprehensive (EU).

Табела 44 Комплетот за екстракција влијае врз валидноста на библиотечниот материјал

Тип варијанта	Мерен показател за контрола на квалитет на библиотечен материјал	Средна разлика во однос на комплетот 1
Мали варијанти ДНК/TMB	Медијална покриеност на егзонот (број) PCT Exon50X (%) Медијална големина на внес (bp)	Комплет 2 понизок за 56 отчитувања Комплет 3 повисок за 0,298 % Комплет 2 и комплет 3 пониски за 3 bp
ДНК MSI	Употребливи локации на MSI	Комплет 3 повисок за 8 локации
Амплификација на ДНК гени	Покриеност на MAD (број) Медијален Bin-број	Комплет 2 понизок за 0,0043 Комплет 2 понизок за 0,5825, комплет 3 повисок за 0,3086
РНК (Фузии/Сплајс варијанти)	Медијална големина на внес (bp) Дневник (Медијален CV Gene500X) Вкупно за целните отчитувања	Комплет 3 повисок за 2 bp Комплет 2 повисок за 0,029 Нема значајна разлика

Забележано е дека комплетот 2 и комплетот 3 за екстракција имаат зголемени придружни отчитувања, со цел фузиите и сплајс варијантите во близина на LoD да имаат поголема веројатност за детекција како резултат на изборот на комплетот за екстракција.

Табела 45 Комплетот за екстракција влијае врз одредувањето варијанти

Тип варијанта (единици)	Одредување варијанта (средна разлика во однос на комплетот 1)
Мали варијанти ДНК (VAF)	Нема техничка значајност Целни варијанти: разликата помеѓу комплетите беше мала во однос на резидуалниот Нецелни варијанти: Нема значителни разлики за првите два bin на VAF. Нема значајни разлики кога е забележана статистичка значајност.
TMB (мутација по мегабаза)	Не е технички значајна, разликата помеѓу комплетите беше мала во однос на резидуалниот
MSI (% нестабилни локации)	Комплет 3 понизок за 1,9% нестабилни локации
Амплификација на гени (промена во преклопување)	Комплет 2 (0,06) и комплет 3 (0,08) со повисока промена во преклопувања
Фузии (придружни отчитувања)	Комплетот 2 имаше 51 %, а комплетот 3 имаше 23 % зголемување на придружните отчитувања
Сплајс варијанти (придружни отчитувања)	Комплетот 2 и комплетот 3 имаа 48 % зголемување на придружните отчитувања

Супстанции кои го попречуваат процесот

Направена беше евалуација на влијанието на потенцијалните ендогени и егзогени супстанции врз перформансите на анализата TSO Comprehensive (EU). При процесот на екстракција на нуклеинска киселина, во примероците беа додадени ендогени супстанции (меланин и хемоглобин). Беа присутни егзогени супстанции (етанол, ксилен и протеиназа К) за време на процесот на екстракција на нуклеинска киселина и, исто така, беа додадени во пречистена нуклеинска киселина пред подготовката на библиотечен материјал. Онаму каде што беше забележано попречување заради додадената протеиназа К, исто така, беа евалуирани зголемените концентрации на протеиназата К за време на процесот на екстракција. Вишокот на индексни прајмери (15% и 30%) беа додадени за време на подготовката на библиотеката. Беа додадени супстанции на FFPE примероци од мозокот, дојките, дебелото црево, белите дробови, медуларната тироидна жлезда, NSCLC, јајниците, простатата, плунковните жлезди, кожата, мекото ткиво и ткивото на тироидната жлезда—осум примерока беа екстрахирани за анализа на ДНК и 13 беа екстрахирани за анализа на РНК. За индексни прајмери, за анализа на ДНК беа користени шест FFPE примероци од три различни типа ткива (тироидна жлезда, мочен меур, дебело црево), а за анализа на РНК беа користени пет FFPE примероци од четири различни типа ткива (бели дробови, тироидна жлезда, дебело црево, дојка). Имаше ендеген контролен примерок што не беше додаден и пуфер или егзоген контролен примерок додаден во вода за секој од 16-те уникатни примероци. Беше направена процена на влијанието на некрозата врз различна група од 8 примероци FFPE од мозочното,

ткивото од дебелото црево и белодробното ткиво. За секој некротичен примерок беше спроведена и контрола со макродисецирање, без некроза. За сите попречувања беа испитани четири репликати по примерок по супстанција со анализата TSO Comprehensive (EU) и беа споредени со нивниот соодветен контролен примерок за детекција мали варијанти ДНК, амплификација на гени, фузии на РНК и сплајс варијанти на РНК, како и за статусот за MSI и оценката за TMB. Беа вклучени и варијантите CDx и туморско профилирање.

Детекција на ДНК варијанта

Меланинот (0,2 µg/ml), хемоглобинот (2 mg/ml), етанолот (5 %), протеиназата К (0,04 mg/ml во нуклеинска киселина) и ксиленот (0,0001 %) не влијаат врз оценката за TMB, статусот за MSI, малите варијанти ДНК и амплификациите на гени.

Детекција на РНК варијанта

Податоците не поддржуваат попречување од меланин (0,2 µg/ml), етанол (5%) и ксилен (0,0001%) кај фузиите или сплајс варијантите на РНК. Хемоглобинот (2 mg/ml) попречуваше (редуцирани придружни отчитувања) три различни сплајс варијанти во генот MET. Сплајс варијантата во генот AR (три различни примероци) и една во генот EGFR (еден примерок) не беа засегнати. Ако лабораторијата обработува РНК со анализата, ткивото со хемоглобин треба да се избегнува или минимизира кога се земаат парчиња од ткивниот блок.

Протеиназата К (0,04 mg/ml во нуклеинска киселина) ги попречуваше фузиите и сплајс варијантите на РНК. Протеиназата К беше тестирана на 2,6 mg/ml и 5,2 mg/ml за време на процесот на екстракција, што е 2x и 4x повеќе од стандардната концентрација во комерцијално достапен комплет. Фузиите беа инхибирани со 4x, но не и со 2x од протеиназата К. Сплајс варијантите беа инхибирани со 2x од протеиназата К. Протеиназата К или еквивалентен ензим не треба да се зголемуваат за време на екстракција повеќе од стандардната концентрација обезбедена во комплет за екстракција.

Читањата што ги поддржуваат варијантите на сплајс се намалуваат со 30% вишок на индексни прајмери, но не и со 15% вишок.

Некроза

Присуството на некротично ткиво до 70% не влијае врз детекција на оценката за TMB, статусот за MSI или малите варијанти ДНК. Детекцијата на варијанти на РНК (придружни отчитувања) и на амплификација гени (промена во преклопувања) беа редуцирани во примероците со $\geq 25\%$ и ≥ 23 (по површина) некротична содржина во ткивната површина, соодветно. Ако деловите од примерокот содржат повеќе $\geq 23\%$ некроза во целата ткивна површина, тогаш мора да се изврши макродисекција на некротичното ткиво.

Стабилност

Стабилност во реално време

За да се утврди рокот на траење на TSO Comprehensive (EU) комплетот за анализа при соодветно чување, како што е наведено на етикетата, се користеше стабилност во реално време. Концептот на студијата се засноваше врз испитување три серии реагенси и се користеше концептот на класичната студија за стабилност, опишана во CLSI EP25-A. За време на студијата, комплетите се чуваа во финалната конфигурација за комплети, во условите наведени на етикетата од производот. Замрзнатите компоненти од комплетот се чуваа на температура од -15°C до -25°C. Компонентите од комплетот кои се чуваа во ладилник, се чуваа на температура од 2°C до 8°C.

Комплетите беа испитувани во наведените временски точки во однос на изгледот и функционалните критериуми за пуштање во работа. Исто така, беа анализирани трендовите на мерните показатели за контрола на квалитет на примерок и одредување варијанти, во однос на контролниот материјал за контрола на квалитет. За секој реагенс беше одреден рокот на траење. Датумот на рокот на траење беше доделен според датумот на производство и рокот на траење. Рокот на траење на комплетот се доделува според реагенсот со најкраток рок на траење.

Стабилност при користење на комплетот

Беше евалуирана стабилноста при користење на комплетот за анализа TSO Comprehensive (EU) при стандардни услови на користење во рамките на рокот на траење за да се поддржи повеќекратна употреба на комплетот. Комплетот со реагенси беше подложен на неколку замрзнувања/одмрзнувања и беше испитано дали поддржува до 4 употреби. Исто така, 3 пати беа подготвени 8 библиотечни материјали за РНК и 8 за ДНК за да се испита колкав е максималниот број библиотечни материјали кои ги поддржува (24 библиотечни материјали за ДНК и 24 за РНК по комплет). Беа исполнети сите функционални критериуми за користење на комплетот, за сите временски точки и циклуси на замрзнување/одмрзнување кои беа испитувани. Беше извршено испитување на примероци FFPE со реагенси стари ≥ 25 месеци за да се процени влијанието на тестирањето при употребата врз одредување варијанти. Квалитативната анализа на целните варијанти укажува дека случаите при употребата не влијаат врз одредувањето варијанти.

Стабилност на нуклеинска киселина

Стабилноста на нуклеинските киселини (ДНК и РНК) и нивната поврзана квантитација за употреба со анализата TSO Comprehensive (EU) беше евалуирана со употреба на FFPE примероци од повеќе типови ткива. Блоките FFPE беа пресечени и сите нуклеински киселини беа екстрахирани одеднаш. Екстрахираната нуклеинска киселина беше темелно измешана, квантифицирана, беше проверен квалитетот на нуклеинската киселина и беше распределена во два сета епрувети за еднократна употреба што требаше да се замрзнат во две временски точки: Контролен примерок T0 (основна линија) и примерок за тестирање T1 (≥ 28 дена). Целата екстрахирана РНК беше складирана на -85°C до -65°C и целата екстрахирана ДНК беше складирана на -25°C до -15°C за наведените временски периоди, а потоа

беше обработена со TSO Comprehensive (EU) анализата меѓу повеќе реплики и оператори. Состојбата на примерокот за тестирање T1 беше споредена со онаа на контролниот примерок во однос на статусот MSI, резултатот за TMB, амплификациите на гени, малите варијанти ДНК, фузии на РНК и сплајс варијантите (на спојување) на РНК. Податоците покажуваат дека нуклеинските киселини и нивната поврзана квантитација за употреба со анализата на TSO Comprehensive (EU) се стабилни до 28 дена кога се чуваат на препорачаните температури (РНК од -85°C до -65°C и ДНК од -25°C до -15°C).

Стабилност на библиотечен материјал

Стабилноста на библиотечниот материјал што ги користат секоја од шесте безбедни точки на запирање за анализата (видете ја [Табела 5](#)) беше оценета со користење на FFPE примероци од повеќе типови ткива. Контролните библиотечни материјали (T0, без точки на запирање) беа секвенционирани веднаш на крајот од работниот тек. Аликвоти од истите библиотечни материјали беа чувани на точките на запирање на -25°C до -15°C за времето (T1) за да се поддржат деновите наведени во [Табела 5](#). T1 беше спореден со T0 за мали ДНК варијанти, TMB, генски амплификации, MSI, РНК фузии и варијанти на РНК сплајс со CDx и варијанти на профилирање на тумор. Податоците покажуваат дека библиотечните материјали генерирани од TSO Comprehensive (EU) анализата е стабилна во согласност со упатствата за употреба.

Стабилност на ткиво FFPE поставено врз предметно стакло

Стабилноста на ткиво FFPE поставено врз предметно стакло за употреба со анализата TSO Comprehensive (EU) беше оценета со сецирање FFPE блокови (делови од 5 µm) од различни уникатни примероци, поставени на предметни стакла, по што беа складирани на собна температура (22°C) во 2 временски точки. РНК беше екстрахирана и складирана на -65°C до -85°C, а ДНК беше екстрахирана и складирана на -15°C до -25°C помалку од 1 недела пред тестирањето. Материјалот од нуклеинска киселина беше квантифициран и потоа обработен со анализата TSO Comprehensive (EU) во рок од 24 часа во секоја од временските точки. Во секоја временска точка, повеќекратни реплики и оператори по примерок беа тестирани со анализата TSO Comprehensive (EU) и споредени со временската точка T0 за MSI, TMB, амплификации на гени, мали варијанти ДНК, фузии на РНК и сплајс варијанти на РНК, вклучувајќи CDx и варијанти од профилирање тумори. Беше проценето одредувањето на варијантите и ги исполни сите критериуми за прифаќање, што покажува дека ткивата FFPE поставени на предметни стакла за употреба со анализата TSO Comprehensive (EU) се стабилни на собна температура до 4 седмици (28 дена). Забележано е дека е откриено намалување од 10% на стапката на валидност на QC на MSI библиотечниот материјал по 4 недели (28 дена) поради комбинација од операторот и времето на складирање. Фузиите на РНК и варијантите на сплајс имаа приближно 29% намалување на придружните читања по складирање на слајдови во тек на 4 недели (28 дена).

Заштитна лента за титрација на влезна нуклеинска киселина

Беше направена евалуација на внесот на нуклеинска киселина за анализата TSO Comprehensive (EU) така што беше испитана ДНК од 33 примероци FFPE кои опфаќаат 17 типа ткива, на ниво на внес кое изнесува од 10 ng до 500 ng, и беше испитана РНК од 5 примероци FFPE од 5 типа ткива на ниво на внес кое изнесува од 10 ng до 85 ng. Беа евалуирани мерните показатели за контрола на квалитет и тие беа зависни од примерокот. Резултатите од ДНК покажаа дека некои, но не сите, мерни показатели за контрола на квалитет реагираа на зголемениот внес над номиналниот внес од 40 ng:

- Кај MEDIAN_INSERT_SIZE немаше реакција при внес поголем од 30 ng.
- Кај MEDIAN_EXON_COVERAGE имаше позитивна корелација со зголемување на внесот.
- PCT_EXON_50X се зголемуваше со зголемување на внесот до 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES се зголемуваше со зголемување на внесот. Некои примероци со помалку од 40 USABLE_MSI_SITES при 40 ng ги исполнија спецификациите при повисок внес, со што можеше да се пресмета оценката за MSI.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET се зголемуваше со зголемување на внесот.
- Со зголемување на внесот се зголемува COVERAGE_MAD кон горната граница на спецификација.

Мерните показатели за контрола на квалитет за примерок од РНК се зголемуваа (MEDIAN_INSERT_SIZE и TOTAL_ON_TARGET_READS) или намалуваа (MEDIAN_CV_GENE_500X) од 10 ng до 40 ng, но во глобала немаше промени кога внесот беше помеѓу 40 ng и 85 ng.

Граница на празен примерок

Процентот лажно позитивни резултати (од вкупниот број очекувани негативни резултати) беше проценет со репликатно испитување на нормално или бенигно, соседно ткиво FFPE кое не треба да содржи соматски варијанти за мали варијанти ДНК, амплификација на гени, MSI, фузии на РНК и сплајс варијанти на РНК. Лажно позитивните резултати не беа анализирани за TMB бидејќи не постои клиничка гранична вредност. Шест примероци од ДНК и 6 од РНК FFPE беа обработени во дупликат кај 2 оператори, во 3 дена, за секоја од 2-те серии реагенси. Подгрупа примероци беше повторно групирана и повторно секвенционирана во форма 3x само ДНК и 3x само РНК, за да се евалуираат лажно позитивните резултати со неколку мултиплекс конфигурации кои ги поддржува овој уред. Исто така, беа обработени 30 дополнителни примероци РНК во дупликат, преработени со 1 серија реагенс, поделени помеѓу 2 оператори. Сè на сè, имаше 168 можни опсервации за ДНК и 228 опсервации за РНК, број кој беше намален со неважечките библиотечни материјали за секој тип варијанта. Процентот лажно негативни резултати беше пресметан на ниво на ген за амплификација и на ниво на позиција (приближно 1,9 милиони позиции) за мали варијанти ДНК. Процентот на лажно позитивни резултати за типовите на ДНК варијанти е прикажан во [Табела 46](#). TSO Comprehensive (EU) нема тврдења за CDx (Ниво 1) за мали ДНК варијанти, па затоа не можат да се пријават лажно позитивни резултати за мали ДНК варијанти за Ниво 1. 271 лажно позитивни резултати беа израмнети од TSO Comprehensive (EU) База на знаење.

Немаше клинички значајни лажни позитивни резултати (Ниво 2). Имаше 4 лажно позитивни резултати во ниво 3 кои произлегоа од 2 варијанти во 4 (2,4%) набљудувања од 168 набљудувања. Процентот лажно позитивни резултати за фузиите PNH и сплајс варијантите беше 0 %, како што е прикажано во [Табела 47](#).

Табела 46 Лажно позитивни резултати според тип варијанта на ДНК

Тип варијанта	Лажно позитивни резултати
Амплификација на гени	0 % (0/9912)
Мали варијанти ДНК	0,0001 % (271/295.801.567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Н/П*

* Лажно позитивните резултати не се применливи бидејќи TMB е пријавено како оценка и нема квалитативен исход.

Табела 47 Лажно позитивни резултати според тип варијанта на PNH

Тип варијанта	Лажно позитивни резултати
Фузија	0 % (0/227)
Сплајс варијанта	0 % (0/227)

Граница на детекција

Беа спроведени две студии за да се проценат границите на детекција за TSO Comprehensive (EU). Во студија 1 беа евалуирани мали варијанти ДНК RET, фузии RET и фузии NTRK1–3. Во студија 2 беа евалуирани останатите варијанти од профилирање на тумор.

Студија 1

Беа утврдени границите на детекција (LoD) за NTRK1, NTRK3 и RET мали варијанти ДНК и фузиите NTRK1–3 и RET. LoD е најниската вредност на аналитот (на пример, фреквенција на варијанта на алел или придружни отчитувања) која може доследно да се детектира (граница на детекција од 95 % или грешка тип II од 5 %). Во студијата се користеа ткива FFPE со RET мали варијанти ДНК (медуларен карцином на тироидната жлезда), фузии RET (папиларен карцином на тироидната жлезда, атипичен Spitz тумор) и фузии NTRK1–3 (глиом од низок степен, мултиформен глиобластом, миофибробластичен сарком, сарком, секреторен рак на дојка, рак на дебелото црево), како и FFPE-третирана клеточна линија со NTRK1 и NTRK3 мали варијанти ДНК. Секој примерок беше разреден на најмалку 5 нивоа за испитување (од приближно 0,01–0,10 VAF за мали варијанти ДНК и 2–25 придружни отчитувања за фузии). Имаше 18 опсервации за секое ниво на испитување по серија по варијанта, генерирани од 3 оператори и 3 инструменти за секвенционирање, кои иницираа подготовка на библиотечен материјал 3 непоследователни дена со 2 репликати од секое ниво за испитување примерок. Беа испитани две серии реагенси.

За варијанти на ДНК, двете серии беа независно анализирани со помош на пробитна регресија или пристапот на стапка на погодок (најниско ниво на испитување со стапка на погодок (процена на точка) $\geq 95\%$) за да се одреди LoD за секоја варијанта по лот. Поголемата LoD кај двете серии реагенси беше земена како граница на детекција за варијантата (Табела 48).

За фузиите PHK се користеа FFPE клеточни линии за да се направи проценка на вредностите за LoD за секоја фузија на гени. Потоа LoD беа потврдени со ткива FFPE користејќи ги дупликатите од подготвениот библиотечен материјал со помош на 3 оператори, 3 инструменти и 3 серии реагенси за да се генерираат 54 опсервации по варијанта блиску до воспоставената LoD со FFPE клеточни линии. Наведените граници на детекција за секоја фузија (Табела 49) се најниската средна вредност на придружни отчитувања која ја достигнала стапката на погодок (процена на точка) $\geq 95\%$.

Табела 48 Граница на детекција за NTRK1, NTRK3 и RET мали варијанти ДНК

Маркер	Chr ¹	Позиција	Упатување	Алтернатива	Граница на детекција (Фреквенција на варијанта на алел)
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 (делеција)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0.055

Chr = хромозом

* Овие варијанти на ДНК беа анализирани со пробитна регресија; останатите варијанти на ДНК беа анализирани со пристапот стапка на погодок.

Табела 49 Граница на детекција за фузии NTRK и RET

Ген	Фузија	Граница на детекција (придружни отчитувања)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Студија 2

Беа евалуирани границите на детекција (LoD) на профилирање варијанти на тумор пријавени со TSO Comprehensive (EU). LoD е најниската вредност на аналитот (фреквенција на варијанта на алел, промена во преклопување или придружни отчитувања) која може доследно да се детектира (стапка на погодок од 95% или грешка тип II од 5%). Примероците FFPE од 17 типови ткива кои содржат варијанти, беа разредени до различни нивоа на испитување. Беа генерирани шест опсервации по ниво, од двајца оператори, каде што секој користеше различен инструмент и различна серија реагенс.

Варијанти на ДНК

Беа утврдени LoD за 10 класи мали варијанти ДНК (вкупно 25 варијанти) и 2 амплификации на ДНК гени (ERBB2 и MET) и резимирани се како опсези во (Табела 50). Вклучени и се варијантите RET од Студијата 1 LoD. Две од 3 инсерции поголеми од 5 bp имаа LoD од 0,034 и 0,036 VAF, а третата имаше LoD од 0,215 VAF. Последната инсерција беше инсерција во регија со мала сложеност, каде што инсерцијата додава дополнителни повторувања, влијае врз порамнувањето и потребни се повеќе отчитувања за доследна детекција. Според тоа, некои геномски контексти со мала сложеност може да влијаат врз детекцијата на инсерции > 5 bp.

Табела 50 Граница на детекција за мали варијанти ДНК и амплификација на гени

Тип (Единица мерка за LoD)	Класа варијанта/ геномски контекст	Број на варијанти	Домет (VAF)
Мали варијанти ДНК (фреквенција на варијанта на алел)	SNV	5	0,016-0,064
	MNV-и	3	0,022-0,048
	Инсерција (1–2bp) во близина на хомополимерни повторувања	2	0,086-0,104
	Инсерција (1–2bp) во близина на динуклеотидни повторувања	2	0,038-0,051
	Инсерција (3–5bp)	2	0,030-0,056
	Инсерција (> 5 bp и до 25 bp)	3	0,034-0,215
	Делеција (1–2bp) во близина на хомополимерни повторувања	2	0,094-0,100
	Делеција (1–2bp) во близина на динуклеотидни повторувања	2	0,033-0,070
	Делеција (3–5bp)	2	0,028-0,064
	Делеција (> 5 и до 25 bp)	2	0,047-0,055
Амплификација на гени (промена во преклопување)	По ген (ERBB2, MET)	2	1.539, 1.570

Анализата на нецелните варијанти беше извршена од примероци од Студија 1 кои имаа најмалку пет нивоа на тестирање. Секоја нецелна варијанта беше анализирана поединечно и LoD беше проценет само за варијанти со најмалку едно ниво > 0% и ≤ 95% стапка на погодок, и барем едно ниво ≥ 95% стапка на погодок. Табела 51 ги прикажува перцентилите заедно со минималните и максималните LoDs забележани по класа за нецелните варијанти. Нецелните варијанти обезбедуваат повеќе варијанти по класа отколку што беа тестирани во Студија 2 и се во согласност со опсезите на LoD од Табела 50.

Табела 51 Резиме на статистика за границите на детекција по класа на нецелни варијанти (од Студија 1)

Класа	N	Мин	(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
Инсерција	24	0.039	0.060	0,084	0.097	0.166	0.261
Делеција	24	0.034	0.063	0.081	0.089	0.124	0.167

Фузии

Беа одредени LoD за 19 фузии кои опфаќаат 20 гени во панелот на TSO Comprehensive (EU), чиј опсег беше од 9 до 31,3 придружни отчитувања (Табела 52). Дополнителни 3 гени (NTRK1–3) беа испитани во другата студија. Генот RET беше испитан и овде и во другата студија. Податоците за шеснаесет фузии со одредени LoD беа доследни со заедничката LoD за 16 придружни отчитувања, со помош на двостран интервал со горна граница на веродостојност од 95% (UCL). Кај две фузии LoD беа 24,7 и 31,3 придружни отчитувања кои не беа доследни со заедничката LoD.

Фузијата FGFR2-SRPK2 со вредност за LoD од 24,7 придружни отчитувања имаше повторливи регии на преклопување кај точката на прекин, како што беше анотирано од софтверот за анализата TSO Comprehensive (EU). Повторливите регии во рамките на точката на прекин обично имаат пониски нивоа на доказ, бидејќи отчитувањата може да се мапираат на кое било друго место во регијата или, пак, можат да останат непорамнети. Исто така, поради повторливите регии, процесот на склопување (кој се користи за да се идентификуваат секвенците на фузии) претставува поголем предизвик и потребни се дополнителни докази за да се изработи точната секвенца. SEPT14-EGFR е уште еден пример за фузија со хомологна секвенца во точката на прекин.

Фузијата BCL2-IGHJ5 со вредност за LoD од 31,3 придружни отчитувања, имаше многу краток ген (IGHJ5) чија точка на прекин беше близу почетокот на егзонот за што беа потребни испрекинати кратки порамнувања. Следствено на тоа беа потребни повеќе отчитувања за доследна детекција.

Табела 52 Граница на детекција за фузии

Фузија	Точка на прекин за ген А	Точка на прекин за ген Б	LoD	Заедничка LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	да
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	да
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	да
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	да
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	да

Фузија	Точка на прекин за ген А	Точка на прекин за ген Б	LoD	Заедничка LoD
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	да
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	да
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	да
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	да
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	да
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	не
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	да
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	да
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	да
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	да
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	да
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	да
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	не
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	да

Сплајс варијанти

Двете сплајс варијанти на PTK, MET и EGFR, имаа LoD од 18,7 и 16,7 придружни отчитувања.

Содржина на тумор

Резултатите во студијата се препораки за содржината на тумор за клинички примероци. Општо земено, колку е поголема содржината на тумор, толку е повисок сигналот (VAF, промена во преклопување или придружни отчитувања) за варијантите во туморот. Препораките за минимална содржина на тумор се врз основа на следните опсервации. Вредностите за LoD за мали варијанти ДНК не се поголеми од 0,104 VAF (со исклучок за инсерцијата TP53). За да се детектираат мутациите во туморот кои поттикнуваат развој (фреквенција на варијанта на алел од 0,50), се препорачува содржина на тумор од 20% така што VAF за овие мутации би била 0,10 VAF и би била еднаква на или над LoD. При содржина на тумор од 20%, амплифицираните гени со промена на преклопување од 5,5 (11 копии), доследно ќе се детектираат врз основа на границата на детекција со 1,8-кратна промена на преклопување. При содржина на тумор од 20%, фузиите со 74 придружни отчитувања доследно ќе се детектираат врз основа на границата на детекција од 14,7 придружни отчитувања.

Повторливост

Беа спроведени две студии за да се евалуира повторливоста на анализата TSO Comprehensive (EU). Во студија 1 беа евалуирани мали варијанти ДНК RET покрај варијантите на фузиите NTRK и RET. Во студија 2 беа евалуирани дополнителни варијанти од профилирање на тумор.

Студија 1

Оваа студија беше спроведена за да се процени повторливоста на анализата TSO Comprehensive (EU) на 3 локации (центри) за испитување (1 внатрешна, 2 надворешни) со 2 оператора во еден центар, со 2 репликати во рамките на обработката и во 3 непоследователни дена на испитување. Испитувањето се изврши со панел на повторливост во кој беа вклучени примероци ДНК кои содржеа специфични познати мали варијанти ДНК RET и примероци РНК кои содржеа специфични познати NTRK1–3 и варијанти на фузии RET, од примероци на ткива и клеточни линии фиксирани со формалин и обложени со парафин (FFPE). Панелот содржеше ДНК и РНК членови на панелот со варијанти од ниско и од високо ниво, со истиот број членови на панелот од ниско и високо ниво за секоја класа варијанта. Членовите на панелот од високо ниво беа таргетирани приближно 2 до 3 пати повисоко од LoD, а членовите на панелот од ниско ниво беа таргетирани приближно на LoD. Во секој центар, секој оператор ги испита членовите на панелот во дупликат 3 пати, генерирајќи 6 опсервации по цел по член на панел. Од сите 3 центри, 36 опсервации беа генерирани по член на панел (3 центри/инструменти × 2 оператора × 2 репликати во рамките на обработка × 3 почетни дена).

Процентот позитивни одредувања (PPC) и процентот негативни одредувања (PNC) за целните мали варијанти ДНК и целните варијанти на фузии на РНК од високо ниво беа одредени како примарни крајни точки. PPC и PNC за целните мали варијанти ДНК и целните варијанти на фузии на РНК од ниско ниво беа пресметани како секундарни крајни точки. Двостраните интервали на веродостојност од 95% (CI) кои се однесуваат на сите крајни точки беа пресметани со помош на Вилсоновиот метод на оценување. Беа направени примарни анализи за да се оценат PPC и PNC (со 95% CI кои се однесуваат на нив) кај целните членови на панелот од високо ниво, комбинирајќи ги опсервациите од анализата TSO Comprehensive (EU) за дадена цел во група членови на панелот кои ја претставуваат соодветната класа варијанти (на пример, мали варијанти ДНК и фузии на РНК) помеѓу центрите/инструментите, операторите и обработките. За секоја целна варијанта, опсервациите од анализата TSO Comprehensive (EU) кај останатите членови на панелот од високо ниво, таргетирани за истиот тип варијанта, но кои не ја содржат истата варијанта како што е утврдено од правилото за мнозинство, беа комбинирани со пресметан PNC. Свкупните PPC и PNC за членовите на панелот од ниско ниво беа утврдени на сличен начин.

Мали варијанти ДНК RET

За членовите на панелот со мали варијанти ДНК на високо ниво, свкупниот PPC беше 100,0% (207/207; 95% CI: 98,2% до 100,0%) (Табела 53). Свкупниот PNC за членовите на панелот со мали варијанти ДНК на високо ниво, беше 100,0% (1035/1035; 95% CI: 99,6% до 100,0%) (Табела 54). За целните членови на

панелот со мали варијанти ДНК на ниско ниво, севкупниот PPC за целните членови на панелот со мали варијанти ДНК на ниско ниво беше 99,1% (210/212; 95% CI: 96,6% до 99,7%), а севкупниот PNC беше 100,0% (1026/1026; 95% CI: 99,6% до 100,0%).

Табела 53 PPC за анализата TSO Comprehensive (EU) за детекција на RET мали варијанти ДНК кај целни членови на панелот од високо и ниско ниво

Ниво на варијанта	Тип варијанта	Целна варијанта (нуклеотид)	Целна варијанта (аминокиселина)	N	Средна VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Бришење	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Инсерција	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Сите мали ДНК варијанти високи	Сите мали ДНК варијанти високи	Сите мали ДНК варијанти високи	207	Н/П 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)
	Бришење	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Инсерција	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Сите мали ДНК варијанти ниски	Сите мали ДНК варијанти ниски	Сите мали ДНК варијанти ниски	212	Н/П ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

Кратенки: Н/П, не е применливо; VAF, фреквенција на варијанта на алел.

² Двостран интервал на веродостојност од 95%, пресметан со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

Табела 54 PNC за анализата TSO Comprehensive (EU) за детекција на RET мали варијанти ДНК кај целни членови на панелот од високо и ниско ниво

Ниво на варијанта	Тип варијанта	Целна варијанта (нуклеотид)	Целна варијанта (аминокиселина)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Бришење	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Инсерција	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Сите мали ДНК варијанти високи	Сите мали ДНК варијанти високи	Сите мали ДНК варијанти високи	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Бришење	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Инсерција	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Сите мали ДНК варијанти ниски	Сите мали ДНК варијанти ниски	Сите мали ДНК варијанти ниски	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Сите опсервации се збир од комбинации на член на панел и варијанта за кои најголемиот дел од одредувањата се негативни (целните варијанти кои содржат фузии со помалку од 50% позитивни одредувања).

² Двостран интервал на веродостојност од 95%, пресметан со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

Во [Табела 55](#) е прикажана анализата на компонентите на варијансата за фреквенциите на варијанта на алел (VAF) во приближно 36 опсервации за секој член на панелот. Стандардното отстапување (SD) и процентот на коефициентот на варијација (%CV; вкупно и за секој извор) се пресметани и претставени за секоја целна мала варијанта ДНК RET.

Табела 55 Анализа на компонентите на варијансата на VAF со анализата TSO Comprehensive (EU) во целните членови на панелот за мали варијанти ДНК

Ниво на варијанта	Тип варијанта	Целна варијанта (нуклеотид)	Целна варијанта (амино киселина)	N	Средна VAF	SD (%CV) на местото	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на денот	SD (%CV) на репликат	Вкупно SD (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Бришење	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)
	Инсерција	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)
	Бришење	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)
	Инсерција	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)

Фузии NTRK 1 – 3 и RET

За членовите на панелот со фузии на PNH од високо ниво, севкупниот PPC изнесуваше 99,3% (285/287; 95% CI: 97,5% до 99,8%) (Табела 56). За секој член на панелот од високо ниво, PPC изнесуваше 100%, освен за членот на панелот BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; 95% CI: 81,9% до 98,5%]). Севкупниот PNC за членовите на панелот со фузии на PNH од високо ниво, изнесуваше 100,0% (1724/1724; 95% CI: 99,8% до 100,0%) (Табела 57). За членовите на панелот со фузии на PNH од ниско ниво, севкупниот PPC изнесуваше 95,4% (272/285; 95% CI: 92,3% до 97,3%), а севкупниот PNC изнесуваше 100,0% (1851/1851; 95% CI: 99,8% до 100,0%).

Табела 56 PPC за TSO Comprehensive (EU) анализата за детекција на фузии NTRK и RET кај целни членови на панелот од високо и ниско ниво

Ниво на варијанта	Целна фузија	N	Средна вредност на придружни отчитувања	PPC (%) (n/N)	95% CI*
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Сите фузии се од високо ниво	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%)
	Сите фузии се од ниско ниво	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* Двостран интервал на веродостојност (CI) од 95%, пресметан со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

Табела 57 PNC за TSO Comprehensive (EU) анализата за детекција на фузии NTRK и RET кај нецелни членови на панелот од високо и ниско ниво

Ниво на варијанта	Целни фузии	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0% (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Сите фузии се од високо ниво	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Сите фузии се од ниско ниво	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Сите опсервации се збир од комбинации на член на панел и варијанта за кои најголемиот дел од одредувањата се негативни (целните варијанти кои содржат фузии со помалку од 50% позитивни одредувања).

² Двостран интервал на веродостојност (CI) од 95%, пресметан со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

Во Табела 58 е прикажана анализа на компонентите на варијансата за придружните отчитувања во приближно 36 опсервации во рамки на секоја целна фузија. За секоја целна фузија се пресметани и претставени SD и %CV (вкупно и за секој извор).

Табела 58 TSO Comprehensive (EU) Анализа за компонентите на варијансата на анализата на придружните отчитувања во целните членови на панелот за фузии на PNH

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

Студија 2

Беше спроведена втора студија за да се процени повторливоста на анализата TSO Comprehensive (EU) во 3 центри за испитување (2 надворешни и 1 внатрешен), 2 оператори/инструменти по центар, 3 единствени серии со реагенси, 4 дена на испитување (непоследователни) и 2 обработки со секвенционирање по примерок библиотечен материјал.

Испитувањето беше извршено со примероци екстрахирана ДНК и РНК од 41 примерок ткиво FFPE и 1 клеточна линија FFPE (со 1 примерок ткиво FFPE и клеточна линија FFPE кои се користат за креирање два члена по панел). Примероците ткиво се состоеја од следните типови: мочен меур, коска, мозок, дојка, дебело црево, јејунум, бубрег, црн дроб, бел дроб, јајник, простата, кожа, меко ткиво, желудник, тироидна жлезда и матка. Беа испитани вкупно 44 членови на панелот, вклучувајќи и ДНК членови на панелот со мали варијанти ДНК (SNV, MNV, инсерции и делеции), амплификации на гени, различни оценки за TMB, оценки за висока MSI и РНК членови на панелот со фузии и сплајс варијанти. Повеќето членови на панелот имаа познати целни варијанти на нивоа приближно 2 до 3 пати поголеми од границата на детекција специфична за варијантата (~2–3xLoD).

LoD е концентрацијата на аналити при која забележаните резултати од анализата се позитивни (детектирана варијанта во однос на граничната вредност за анализата TSO Comprehensive (EU) $\geq 95\%$ од времето. Средните забележани вредности за нивоа на варијантата беа категоризирани како приближно $< 2 \times \text{LoD}$ (забележани нивоа на варијанта на $< 1,5 \times \text{LoD}$), $\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$ (забележани нивоа на варијанта на $1,5 \times \text{LoD}$ до $3,4 \times \text{LoD}$) и приближно $> 3 \times \text{LoD}$ (забележани нивоа на варијанта на $> 3,4 \times \text{LoD}$).

Процентот позитивни одредувања (PPC) за мали варијанти ДНК, амплификации на гени, MSI-High, и варијанти на РНК беа пресметани со комбинирање на опсервациите во обработките со секвенционирање и центрите. Процентот негативни одредувања (PNC) беше пресметан на сличен начин за мали варијанти ДНК, амплификации на гени и варијанти на РНК. За секоја позната целна варијанта, опсервациите од анализата TSO Comprehensive (EU) кај членовите на панелот од истиот тип варијанта, но кои содржат други варијанти, кои не се добиени од истиот извор на примерок, ниту пак го исполнуваат правилото за мнозинство за таа варијанта, ($< 50\%$ од одредувањата биле позитивни) беа комбинирани во рамките на локациите, операторите/инструментите, деновите, сериите реагенси и обработките со секвенционирање за да се пресмета PNC. Двостраните интервали на веродостојност од 95% (CI) беа пресметани со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

Мали варијанти ДНК

Во [Табела 59](#) се прикажани PPC за целните мали варијанти ДНК. Опсегот на PPC е од $91,3\%$ за BRAF SNV до 100% за повеќето мали варијанти ДНК.

Табела 59 PPC за анализата TSO Comprehensive (EU) за детекција на мали варијанти ДНК кај комбинирани целни членови на панелот

Забележано ниво на варијанта ¹	Тип варијанта	Целна варијанта (нуклеотид)	Целна варијанта (амино киселина)	Средна VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	БРИШЕЊЕ	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	БРИШЕЊЕ	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ИНСЕРЦИЈА	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ИНСЕРЦИЈА	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
$< 2 \times \text{LoD}$	ИНСЕРЦИЈА	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)

Забележано ниво на варијанта ¹	Тип варијанта	Целна варијанта (нуклеотид)	Целна варијанта (амино киселина)	Средна VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
~2-3x LoD	БРИШЕЊЕ	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	БРИШЕЊЕ	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	ИНСЕРЦИЈА	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	ИНСЕРЦИЈА	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	БРИШЕЊЕ	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	ИНСЕРЦИЈА	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	ИНСЕРЦИЈА	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Нивото на варијанта пресметано од средната забележана фреквенција на варијанта на алел.

² Средната фреквенција на варијанта на алел е пресметана од забележаните резултати од анализата.

³ Двостран интервал на веродостојност од 95%, пресметан со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

Кај малите варијанти ДНК, PNC беа 100%.

Во [Табела 60](#) е прикажана анализата на компонентите на варијансата за резултатите за VAF за секој извор на варијација и вкупната варијација во сите членови на панелот со целни мали варијанти ДНК.

Табела 60 Анализа на компонентите на варијансата за VAF за целните мали варијанти ДНК

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

Имаше две мали целни варијанти ДНК за кои бројот на опсервации беше премногу мал за да може да се приложи модел за компоненти на варијансата. Кај тие две целни варијанти, севкупните SD беа 0,027 за варијантата chr1_27024001_C_CG и 0,001 за варијантата chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Амплификација на гени

Во [Табела 61](#) се прикажани PPC за целните амплификации на гени. PPC изнесуваа 100,0% за MET и 100,0% за ERBB2.

Табела 61 PPC за анализата TSO Comprehensive (EU) за детекција на амплификации на гени кај комбинирани целни членови на панелот

Забележано ниво на варијанта ¹	Целна варијанта	Средна вредност на забележаната промена во преклопувањето ²	Процент позитивни одредувања (%)	95% CI ³
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Ниво на варијанта пресметано од средната вредност на забележаните промени во преклопување.

² Средната вредност на промените во преклопувањето пресметана од забележаните резултати од анализата.

³ Двостран интервал на веродостојност од 95%, пресметан со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

PNC изнесуваа 100% во амплификациите на гени.

Во [Табела 62](#) е прикажана анализата за компонентите на варијансата за резултатите од промената во преклопувањето за секој извор на варијација и вкупната варијација во сите членови на панелот со целни амплификации на гени.

Табела 62 Анализа на компоненти на варијансата во однос на промената на преклопувањето за целните амплификации на гени

Целна варијанта	N	Средна вредност на промената во преклопувањето	SD (%CV) на местото	SD (%CV) на оператор (место)	SD (%CV) на денот (место, оператор)	SD (%CV) на серија	SD (%CV) на обработка	Вкупно SD (%CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Во [Табела 63](#) се прикажани PPC за целните членови на панелот за MSI-H. PPC изнесуваа 100% за двата високи члена на панелот за MSI.

Табела 63 PPC за TSO Comprehensive (EU) анализата за детекција на статусот MSI-H кај комбинирани целни членови на панелот

Член на панелот	Средна оценка за MSI ¹	N	Процент позитивни одредувања (%)	95% CI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
TPSBD6	55,7	32	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
Сите членови		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Средната забележана оценка за MSI пресметана од забележаните резултати од анализата.

² Двостран интервал на веродостојност од 95%, пресметан со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

Во [Табела 64](#) е прикажана анализата за компонентите на варијансата за резултатите од оценката за MSI за секој извор на варијација и вкупната варијација во сите членови на панелот со целен висок статус MSI.

Табела 64 Анализа на компонентите на варијансата во однос на оценката за MSI за целните членови на панелот за MSI-H

Член на панелот	N	Средна оценка за MSI	SD (%CV) на местото	SD (%CV) на оператор (место)	SD (%CV) на денот (место, оператор)	SD (%CV) на серија	SD (%CV) на обработка	Вкупно SD (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

За да се евалуира повторливоста на оценките за TMB, беше спроведена квантитативна анализа на оценката кај целните членови на панелот за TMB, што претставуваше опсег на очекуваните оценки за TMB. Во [Табела 65](#) е прикажана анализата на компонентите на варијансата за резултатите од оценката за TMB за секој извор на варијација и вкупната варијација во сите членови на панелот за TMB. Вкупните SD на оценката за TMB изнесуваа 1,0 (%CV = 13) за еден член на панелот (средна оценка за TMB = 7,6) и 1,1 (%CV = 2) за друг член на панелот (средна оценка за TMB = 63,2).

Табела 65 Анализа на компонентите на варијансата во однос на оценката за TMB за целните членови на панелот за TMB

Член на панелот*	N	Средна оценка за TMB	SD (%CV) на местото	SD (%CV) на оператор (место)	SD (%CV) на денот (место, оператор)	SD (%CV) на серија	SD (%CV) на обработка	Вкупно SD (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

* Имаше еден член на панелот за TMB за кој бројот на опсервации беше премногу мал ($N = 2$) за да може да се приложи модел за компоненти на варијансата. За тој член на панелот, севкупниот SD изнесуваше 1,7.

Варијанти на РНК

Во [Табела 66](#) се прикажани PPC за целните варијанти на РНК. Опсегот на PPC беше од 91,7% за KIF5B-RET до 100% за повеќето варијанти на РНК.

Табела 66 PPC за анализата TSO Comprehensive (EU) за детекција на варијанти на РНК кај комбинирани целни членови на панелот

Забележано ниво на варијанта ¹	Тип варијанта	Целна варијанта	Средна вредност на придружни отчитувања ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
> 3x LoD	Фузија	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Фузија	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Фузија	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Фузија	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Фузија	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Фузија	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Фузија	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	Фузија	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Фузија	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Фузија	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Фузија	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Фузија	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Фузија	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Фузија	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	Фузија	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
	Фузија	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
> 3x LoD	Фузија	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Сплајс варијанта	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	Сплајс варијанта	Прескокнување на егзонот 14 на MET	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Ниво на варијанта пресметано од средната вредност на забележаните придружни отчитувања.² Средната вредност на придружни отчитувања пресметана од забележаните резултати од анализата.³ Двостран интервал на веродостојност од 95%, пресметан со помош на Вилсоновиот метод на оценување.

За секоја целна варијанта на РНК, PNC беше 100%, освен за фузијата FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60% [984/988; 95% CI: 98,96% до 99,84%]).

Во Табела 67 е прикажана анализата на компонентите на варијансата за резултатите од придружните отчитувања за секој извор на варијација и вкупната варијација во сите членови на панелот со целни варијанти на РНК.

Табела 67 Анализа на компонентите на варијансата за придружните отчитувања за целните варијанти на РНК

Целна варијанта	N	Средна вредност на придружни отчитувања	SD (%CV) на местото	SD (%CV) на оператор (место)	SD (%CV) на денот (место, оператор)	SD (%CV) на серија	SD (%CV) на обработка	Вкупно SD (%CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
Сплајс варијанта EGFR VIII	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Сплајс варијанта со прескокнување на егзонот 14 на MET	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Внатрешно-лабораториска прецизност

Беа спроведени две студии за да се евалуира внатрешно-лабораториската прецизност на TSO Comprehensive (EU). Во студијата 1 се евалуираа фузиите NTRK и RET и мали варијанти ДНК RET. Во студијата 2 се евалуираа TMB и MSI.

Студија 1

Внатрешно-лабораториската прецизност беше евалуирана за фузиите NTRK1–3 (глиом од понизок степен, глиобластом мултиформен, миофибробластичен сарком, секреторен карцином на дојка), фузии RET (рак на тироидната жлезда и кожно ткиво од непознат канцер) и RET мали варијанти ДНК

(медуларен карцином на тироидната жлезда) со ткива FFPE од наведените канцери. Секој примерок беше испитан на ниво на две варијанти: ~1x LoD (ниско ниво на варијанта) и ~2–3x LoD (високо ниво на варијанта) освен за примерокот кој содржи CCDC6-RET, кој беше испитан само на ниско ниво на варијанта. Секој од примероците, на секое ниво на испитување беше обработен во дупликати при секоја подготовка на библиотечен материјал од страна на тројца (3) оператори. Секој оператор започна со подготовка на библиотечниот материјал на три (3) непоследователни почетни дена и вршеше секвенционирање на три (3) инструменти NextSeq 550Dx наменети за таа цел. Беа испитани три (3) серии реагенси, генерирајќи 54 опсервации по ниво. Поради невалидни библиотечни материјали, за некои нивоа има помалку од 54 опсервации.

Квалитативна анализа

Беше направена посебна евалуација на квалитативното совпаѓање за одредувањето варијанти, за две нивоа на варијанта за дадена варијанта од збирните опсервации за сите варијабли (оператори, серии на реагенси, инструменти, денови и репликати). PPC и PNC и поврзаниот двостран интервал на доверба од 95% (Вилсонов скор) се сумирани во [Табела 68](#) (мали ДНК варијанти) и [Табела 69](#) (РНК фузии).

Кај варијантите од високо ниво (~2–3x LoD), анализата TSO Comprehensive (EU) покажа 100% за PPC и PNC за сите испитани варијанти.

Кај варијантите од ниско ниво (~1x LoD), опсегот на PPC за мали варијанти ДНК беше од 83,3% до 98,1%, а опсегот за PPC за фузии на РНК беше од 90,7% до 100%. Кај варијантите чие PPC е < 95%, средните VAF (RET C634Y и RET D898_E901del) или придружните отчитувања (NCOA4-RET и BCAN-NTRK1) беа под соодветните граници на детекција. Кај варијантата од ниско ниво, беше постигнат PNC од 100% за сите варијанти.

Табела 68 Квалитативни резултати за целна варијанта на ДНК

Ниво на варијанта	Варијанта	Тип варијанта	Средна VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3, 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	БРИШЕЊЕ	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*	БРИШЕЊЕ	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Ниво на варијанта	Варијанта	Тип варијанта	Средна VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	БРИШЕЊЕ	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*	БРИШЕЊЕ	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Нуклеотидните промени се наведени за секоја варијанта во делот Граница на детекција, освен за RET D631_L633delinsE, кој е хромозом 10, позиција 43609940, упатување ACGAGCT, алтернатива A.

Табела 69 Квалитативни резултати за целни фузии на РНК

Ниво на варијанта	Фузија	Средна вредност на придружни отчитувања	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE клеточна линија)	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 (примерок 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (примерок 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Ниво на варијанта	Фузија	Средна вредност на придружни отчитувања	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~2-3x LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE клеточна линија)	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	Н/П	Не е испитано	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (примерок 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (примерок 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Квантитативна анализа

Беше направена анализа на компонентите на варијансата со ограничена максимална веројатност (Restricted maximum likelihood (REML)) за да се направи евалуација на вкупната варијација на основната континуирана променлива (VAF за мали варијанти ДНК и придружни отчитувања за фузии на РНК) и процена на компонентите на прецизност [стандардно отстапување (SD), коефициент на варијација (CV)] за секој извор на варијација [оператори, инструменти, денови, серии реагенси, остаток и вкупно]. Резултатите за малите варијанти ДНК се дадени во [Табела 70](#) а за фузиите на РНК во [Табела 71](#).

Варијацијата за VAF се зголемуваше со средната вредност, како што е и очекувано за еден биномен износ. Варијацијата кај придружните отчитувања се зголемуваше со средната вредност, како што е и очекувано со податоците за бројот. Резидуалната компонента имаше најголем придонес кон вкупната варијанса како за малите варијанти ДНК, така и за фузиите на РНК на двете нивоа, со што се поткрепи заклучокот дека детекцијата на овие варијанти со TSO Comprehensive (EU) е робусна во однос на операторите, сериите, инструментите и деновите.

Табела 70 Квантитативни резултати за SD и CV за целните мали варијанти ДНК

Ниво на VAF	Варијанта	Тип варијанта	Број важечки обиди	Средна VAF	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) за инструмент	SD (%CV) на серија	SD (%CV) на денот	SD (%CV) резидуален	Вкупно SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	БРИШЕЊЕ	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	БРИШЕЊЕ	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	БРИШЕЊЕ	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	БРИШЕЊЕ	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)

Табела 71 Квантитативни резултати за SD и CV за целни фузии на PNH

Ниво на придружни отчитувања	Фузија	Број важечки обиди	Средна вредност на придружни отчитувања	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) за инструмент	SD (%CV) на серија	SD (%CV) на денот	SD (%CV) резидуален	Вкупно SD (%CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (клеточна линија)	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 (Примерок 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (Примерок 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)
2-3x LOD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (клеточна линија)	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 (Примерок 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (Примерок 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Студија 2

Внатрешно-лабораториската прецизност беше евалуирана за TMB и MSI. За евалуација на прецизноста на различни нивоа во рамки на оценките беа користени пет примероци ДНК NSCLC FFPE за TMB и седум примероци CRC FFPE за MSI, меѓу кои и MS-Stable и MSI-High. Секој од примероците беше анализиран во две копии од тројца (3) оператори, три (3) дена, со три (3) подготовки библиотечен материјал за три (3) серии реагенси користејќи три инструменти NextSeq 550Dx, коишто генерираат 54 опсервации по ниво.

За статусот на MSI беше евалуирана квалитативната усогласеност. Анализата TSO Comprehensive (EU) покажа 100% усогласеност за процентот позитивни одредувања (%) и за процентот негативни одредувања (%) во однос на статусот на MSI. За TMB, анализата TSO Comprehensive (EU) пријавува оценка за TMB; квалитативната усогласеност не е применлива.

Вкупната варијација на оценката за TMB и MSI, заедно со придонесот по извор (инструменти, оператори, серии, денови и резидуално), е квантифицивана со помош на модел за компоненти на варијансата за даден опсег на оценките. Стандардното отстапување (SD) и коефициентот на варијација (CV) се претставени по ниво во Табела 72 за TMB и Табела 73 за MSI. Поради невалидни библиотечни материјали, за некои нивоа има помалку од 54 опсервации.

Табела 72 Квантитативна оценка за TMB Резултати од SD и CV

Ниво	Средна оценка за TMB	Број важечки обиди	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) за инструмент	SD за серија (%CV)	SD за денот (%CV)	Преостаната стандардна вредност (%CV)	Вкупно SD (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Табела 73 Квантитативна оценка за MSI Резултати од SD и CV

Статус за MSI	Ниво	Средна оценка за MSI (%)	Број важечки обиди	Оператор SD (%CV)	SD (%CV) за инструмент	SD (%CV) на серија	SD (%CV) на денот	SD (%CV) резидуален	Вкупно SD (%CV)
MS-стабилен	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 од високо ниво	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)

Варијацијата во оценките за TMB има обичај да се зголемува со средната вредност, како што се очекува од теоретските распределби на податоците за бројот. Варијацијата кај оценките за MSI за нивоата блиску до оценката за MSI = 50 се поголеми од варијацијата за оценките за MSI кои се поблиску до 0 или 100, во согласност со варијаблката од теоретските распределби за податоците за пропорционалност. Резидуалната компонента и понатаму имаше најголем придонес кон вкупната варијанса како за оценката за MSI, така и за оценката за TMB, со што се поткрепи заклучокот дека резултатите се робусни во поглед на операторите, сериите, инструментите и деновите. Меѓутоа, и MSI и TMB се сложени биомаркери, па аналитичките перформанси може да се разликуваат од еден до друг примерок. Односно, варијацијата на TMB зависи не само од вредноста на TMB, туку и од составот на варијантите во примерокот, како што се типот на варијантата (SNV, Indel) и нивото на VAF (близина до граничната вредност за вклученост). Исто така, варијацијата на MSI зависи не само од вредноста на MSI, туку и од составот на местата во примерокот кои се нестабилни, како и од измерената количина нестабилност по место.

Вредностите C5 и C95 околу граничната вредност од 20,00% беа утврдени за MSI со помош на профил за прецизност (Табела 74).

Табела 74 Интервал C5-C95 за MSI

Оценка	C5	C95
MSI	17,17%	23,32%

Направена е евалуација на влијанието на содржината тумор врз оценките за TMB и MSI. Кај повеќето примероци, содржината на туморот $\geq 30\%$ имаше незначително влијание врз оценките за TMB над приближно 10 мутации по мегабаза. Оценките за TMB останаа релативно непроменети со зголемувањето на содржината на туморот. Кај примероците со висока MSI, содржината на тумор покажа позитивна, линеарна корелација со оценката за MSI. Примероците со висока MSI останаа MSI-High каде што содржината на тумор е $\geq 30\%$. Примероците од ендометриум се однесуваа поинаку во споредба со останатите типови ткива и беше утврдено дека е потребна поголема количина од содржината на туморот за да може да се наречат MSI-High.

Точност на профилирање тумор

Беше направена споредба на детекцијата на варијанти со анализата TSO Comprehensive (EU) и резултатите од референтните методи. Малите варијанти ДНК и TMB беа споредени со надворешен валидиран метод NGS со цел егзом. Амплификациите на гени беа споредени со истиот метод со цел егзом NGS или со методот за валидирана дуална хибридизација In-Situ (DISH) за амплификациите HER2. MSI беше евалуирана со валидиран тест MSI-PCR. Сплајс варијантите на PHK беа споредени со валидиран квантитативен метод за PCR (qPCR). Фузиите ROS1 и ALK беа споредени со валидираните анализи FISH. Сите други фузии беа споредени со композитен метод кој се состоеше од валидирана анализа NGS на целиот PHK-егзом (RNGS1), целен панел NGS(RNGS2) и PCR со дигитални капки (ddPCR).

Детекција на мали варијанти ДНК

Беше направена споредба на детекцијата на мали варијанти ДНК со TSO Comprehensive (EU) анализата со резултатите од секвенционирање цел егзом (WES) за што се користи WES со спарени нормални примероци тумор кои соодветствуваат, за одредување герминативни и соматски мали варијанти. Споредбата помеѓу малите варијанти, кои се состојат од единечни нуклеотидни варијанти (SNVs), инсерции и делеции, беше заснована на 124 примероци од 14 различни типови ткива кои беа валидни како според TSO Comprehensive (EU), така и според WES. Со TSO Comprehensive (EU), но не и со анализата WES, може да се откријат мултинуклеотидни варијанти (MNVs, 2-3 bp) за кои е потребно фазирање. TSO Comprehensive (EU) MNV со беа евалуирани како поединечни SNV наспрема WES. Резимето за совпаѓање на ниво на варијанта, вклучувајќи ги и процентот на позитивна усогласеност (PPA) и процентот на негативна усогласеност (NPA) за сите одредувања варијанти се дадени во Табела 75.

Табела 75 Резиме на совпаѓање за одредување мали варијанти евалуирани според статусот за герминативни или соматски клетки

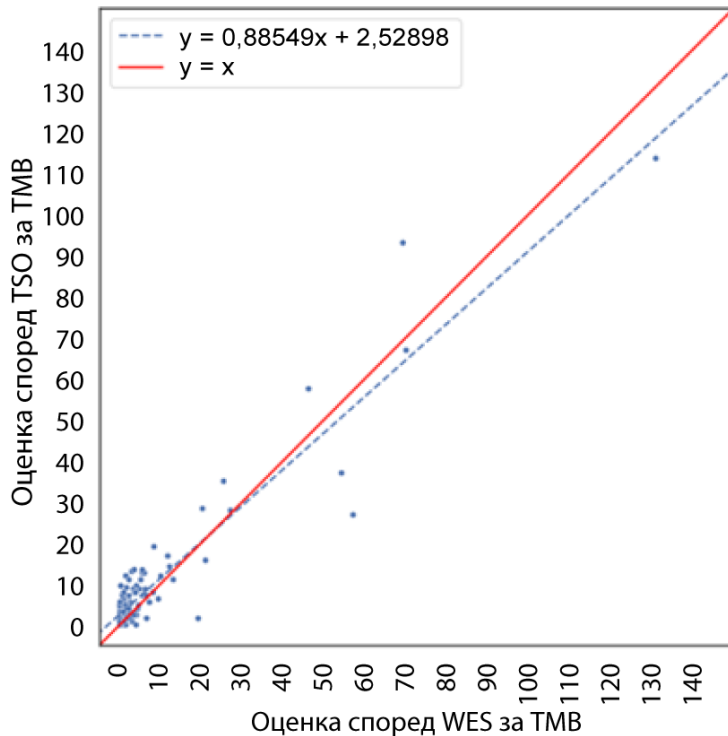
	Одредена соматска варијанта со WES	WES Germline Called	Не е одредено со WES
TSO Comprehensive (EU) Одредено	382	33,163	426
TSO Comprehensive (EU) Не е одредено	69	61	70,000,481
Вкупно	451	33,224	70,000,907
Процент на усогласеност	PPA: 85 % (382/451), 95 % CI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33163/33224) 95 % CI: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70000481/70000907) 95 % CI: [99,999 %– 99,999 %]

Сè на сè, со TSO Comprehensive (EU) беа одредени 426 варијанти кои не беа детектирани со методот за WES. Кај двесте и четири (48 %) од тие варијанти, фреквенцијата на варијанта на алел беше под прагот за одредување со методот за WES. Од преостанатите потенцијално лажно позитивни варијанти, имаше доказ за одредување варијанта со методот за WES, со мала поддршка. Исто така, кај многу од варијантите имаше доказ за многу ниско ниво на WES во нормалните примероци кои соодветствуваат. Резултатот укажува на тоа дека со WES бил направен превид на овие варијанти во туморот поради тумор при нормална контаминација.

Детекција на мутациско оптоварување на тумор

Совпаѓањето на TMB беше утврдено со споредба на оценките за TMB (соматски мутации/мегабази) помеѓу методот WES и TSO Comprehensive (EU) за 124 примероци со расположливи податоци како со TSO Comprehensive (EU), така и со WES. Анализата на линеарна регресија со WES како предиктор имаше у-пресек од 2,53, наклон од 0,89 и Пирсонов коефициент на корелација од 0,94 (Слика 3).

Слика 3 Корелација на оценката за TMB помеѓу WES и TSO Comprehensive (EU)



Детекција на амплификација на гени

Беше направена споредба на детекцијата на амплификацијата на гени со анализата TSO Comprehensive (EU) и резултатите од истата анализа за WES, користејќи или примероци кои соодветствуваат со тумор/нормални или примероци само од тумор. Имаше вкупно 420 примероци, од кои кај 183 беше применет методот за ортогонален тумор-нормално ткиво, а кај 237 беше применет методот само за тумор. Од 420 примероци, 50 примероци беа избрани за студијата бидејќи беа позитивни на амплификација со TSO Comprehensive (EU) или претходен тест. Перформансите за овие карактеризирани примероци беа прилагодени со користење на средна преваленца на фузија. Комбинираните перформанси низ карактеризирани и некарактеризирани примероци користеа пондериран просек со инверзна варијанса. Примероците беа од 14 типа ткива и содржеа амплификации од 55 гени. TSO Comprehensive (EU) пријави генски амплификации од гените MET и ERBB2. Меѓутоа, точноста беше проценета за сите 55 гени. Во Табела 76 е резимирано одредувањето амплификации на гени.

Табела 76 Резиме на конкорданцијата за генски амплификации

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

* Интервалот на доверба е пресметан со bootstrap.

Амплификациите на ERBB2 (HER2) кај гастричните ткива и ткивата од дојка беа анализирани одделно од останатите амплификации на гени со помош на методот Двојна хибридизација In-Situ (DISH). Вкупно беа испитани 116 гастрични и примероци од дојка, од кои 64 претходно беа карактеризирани како HER2 позитивни, според IHC или FISH. Кај еден примерок имаше неуспешна екстракција, 4 примероци не ја поминаа валидноста според TSO Comprehensive (EU) и 3 примероци не ја поминаа валидноста според анализата DISH. Од 108 примероци, 20 (18,5 %) беа со гранична оценка (помеѓу 1,5 и 2,5) блиску до граничната вредност на DISH од 2,0. Резултатите за совпаѓање, вклучувајќи ги PPA, NPA за сите примероци, без граничните случаи HER2 DISH, се прикажани во [Табела 77](#).

Табела 77 Резиме на совпаѓање помеѓу TSO Comprehensive и HER2 DISH, заедно со амплификацијата на генот HER2

Амплификација на генот HER2 Сите (дојка и желудник)	Амплификација на HER2 со DISH	Без амплификација на HER2 со DISH
TSO Comprehensive (EU) Позитивен	17 (вклучувајќи 1 со гранична вредност)	13 (вклучувајќи 1 со гранична вредност)
TSO Comprehensive (EU) Негативен	10 (вклучувајќи 6 со гранична вредност)	68 (вклучувајќи 12 гранична вредност)
Процент на усогласеност вклучувајќи ги и случаите со гранична вредност	PPA: 63 % (17/27) 95 % CI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % CI: [74 %, 90 %]
Процент на усогласеност без случаите со гранична вредност	PPA: 80 % (16/20) 95 % CI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % CI: [72 %, 90 %]

Детекција на нестабилност на микросателит

Беше направена споредба на детекцијата на нестабилност на микросателит со анализата TSO Comprehensive (EU) и резултатите од валидираното испитување MSI-PCR за што се користат примероци кои соодветствуваат со нормален тумор. Беше направена споредба на вкупно 195 примероци, кои го исполнуваа барањето за содржина на тумор од ≥ 30 % и кои претставуваа 14 типа ткива. Со MSI-PCR се проценуваат 5 локации и се добиваат 3 исходи—MSS (без нестабилни локации), MSI-Low (една нестабилна локација) и MSI-High (MSI-H) (две или повеќе нестабилни локации). Со TSO Comprehensive (EU) се проценуваат до 130 микросателитски локации и примероците се класифицираат само како MSS или MSI-High (≥ 20 % нестабилни локации). MSI-Low беа групирани со исходите MSS за MSI-PCR. Анализата за совпаѓање е прикажана во [Табела 78](#).

Табела 78 Резиме на анализата на совпаѓање меѓу TSO Comprehensive (EU) и MSI-PCR за нестабилност на микросателит на ДНК

Статус за MSI	PCR Висока MSI	PCR Ниска MSI	PCR MSI-стабилен
TSO Comprehensive (EU) Нестабилно (MSI-Висок)	(41)	2	0
TSO Comprehensive (EU) Штала MS-стабилен	3	0	150
Вкупно	44	2	150
Процент на усогласеност	PPA: 93 % (41/44) 95 % CI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % CI: [95 %, > 99 %]	

Детекција на сплајс варијанта на РНК

Точноста за детекцијата на сплајс варијанта беше пресметана така што се споредија резултатите од TSO Comprehensive (EU) со оние од анализите qPCR за EGFRvIII и Met Exon 14del вклучувајќи една позната позитивна РНК за секоја од сплајс варијантите. Анализата на совпаѓање беше спроведена на вкупно 230 уникатни РНК примероци FFPE од 14 типа ткива со расположливи податоци како со TSO Comprehensive (EU), така и со референтниот метод. Сите примероци беа испитани за METExon14del, а EGFRvIII беа испитани само на мозочно ткиво. Три примероци беа позитивни за METTSO Comprehensive (EU)Exon>14del со qPCR, но не и со , имаа просечен Ct 37 и беа под TSO Comprehensive (EU) нивото LoD на. Во [Табела 79](#) се резимирали резултатите од студијата на совпаѓање.

Табела 79 Резиме на анализата на совпаѓање меѓу TSO Comprehensive (EU) и qPCR за сплајс варијанти на РНК

Сплајс варијанти на РНК	Позитивни со qPCR	Негативни со qPCR
TSO Comprehensive (EU) Позитивен (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Негативен (EGFRvIII)	0	(13)
TSO Comprehensive (EU) Позитивен (Прескокнување на егзонот 14 на MET)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Негативен (Прескокнување на егзонот 14 на MET)	3	217
Вкупно	7	230
Процент на усогласеност	PPA: 57 % (4/7) 95 % CI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % CI: [98 %, 100 %]

Детекција на фузии PHK

Споредба со композитен метод

TSO Comprehensive (EU) фузиите беа споредени со композитен метод кој се состоеше од секвенционирање цел егзом на PHK со помош на панелот за NGS (RNGS1), целен фузионен панел за NGS (RNGS2) и PCR со дигитални капки (ddPCR).

Методот RNGS1 се поклопува со сите гени за коишто TSO Comprehensive (EU) може да детектира фузии. Меѓутоа, границата на детекција на методот RNGS1 беше 4X – 8X од онаа на TSO Comprehensive (EU) врз основа на бројот на придружни отчитувања запазени при одредувањата на фузиите кои се преклопуваат. Па, затоа се користеше композитен метод со два дополнителни методи со поголема сензитивност, но помала ширина за фузии, заедно со методот WES (RNGS1).

Со RNGS1 беа испитани вкупно 255 единечни примероци PHK кои претставуваа 14 типови ткива и кои ги поминаа TSO Comprehensive (EU) мерните показатели. Два примероци беа неважечки за контролата на квалитетот за примерокот RNGS1 и беа изземени од понатамошните анализи. Од 82-те фузии одредени со TSO Comprehensive (EU), 4 беа изземени од евалуацијата поради тоа што примерокот RNGS1 не ја помина контролата на квалитет, а 7 дополнителни фузии не можеа да се одредат поради недостигот на цели во панелот RNGS1. Од преостанатите 71 фузија што беа одредени со TSO Comprehensive (EU), со RNGS1 беа потврдени 9 фузии. Со RNGS1 беа одредени 4 фузии кои не биле одредени со TSO Comprehensive (EU).

Од 62-те фузии кои беа одреди како позитивни со TSO Comprehensive (EU), а не биле детектирани со RNGS1, 13 се преклопуваа со, и беа потврдени со RNGS2. Една фузија беше одредена со RNGS2 ама не и со TSO Comprehensive (EU).

Потоа се користеше PCR со дигитални капки за фузиите кои беа одредени со TSO Comprehensive (EU), а кои не беа одредени или, пак, не можеа да се одредат со RNGS1, и кои не можеа да се евалуираат со RNGS2 (49). ddPCR, исто така, се користеше за повторна евалуација на 2 од 4 лажно негативни фузии за TSO Comprehensive (EU) со RNGS1 и 2 од 9 конкордни фузии за TSO Comprehensive (EU) и RNGS1.

Негативни примероци од пет фузии беа вклучени при испитувањето на секој позитивен примерок од фузија за да се осигури специфичноста. Осумнаесет фузии не беа тестирани со ddPCR поради неможноста да се изготват прајмери/сонди, неколку генски партнери за фузијата или, пак, недоволно преостанат материјал FFPE. За ddPCR, прајмерите и сондите беа изработени во однос на запазените точки за прекин во анализата TSO Comprehensive (EU)).

Со ddPCR беа детектирани вкупно 52 фузии, од коишто 41 беа одредени со TSO Comprehensive (EU), но не беа одредени или не можеа да се одредат со RNGS1. Девет фузии беа одредени со ddPCR, но беа негативни со TSO Comprehensive (EU) или со RNGS1. Двете фузии позитивни со ddPCR ги потврдија двете конкордни фузии за TSO Comprehensive (EU) и RNGS1. Не беа детектирани фузии со ddPCR за двата лажно негативни примерока со TSO Comprehensive (EU) кои беа повторно евалуирани со RNGS1; меѓутоа, тие се сметаат за лажно негативни врз основа на споредбата со RNGS1.

Од 255 примероци, 35 примероци беа избрани за студијата бидејќи беа позитивни на фузија со TSO Comprehensive (EU) или претходен тест. Перформансите за овие карактеризирани примероци беа прилагодени со користење на средна преваленца на фузија. Комбинираните перформанси низ карактеризирани и некарактеризирани примероци користеа пондериран просек со инверзна варијанса. Методите RNGS1, RNGS2 и ddPCR за композитните резултати за совпаѓање на фузии се прикажани во [Табела 80](#).

66-те фузии кои се во согласност со композитниот метод, претставуваат 43 гени во TSO Comprehensive (EU) панелот. Меѓутоа, фузиите се подобни за пријавување само од 23-те гени наведени во [Табела 80](#).

Табела 80 Резиме на конкорданцијата за РНК фузии

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

* Интервалот на доверба е пресметан со bootstrap.

Споредба со методот FISH за фузиите ROS1 и ALK

Дваесет и пет примероци NSCLC беа испитани со FISH за фузиите ROS1 и ALK, а 5 дополнителни примероци NSCLC беа испитани за фузијата ROS1. Осум примероци не го поминаа методот FISH за ROS1 поради несоодветно ткиво. Две фузии ROS1 и една фузија ALK беа детектирани и TSO Comprehensive (EU) и со FISH. Не беа забележани резултати кои не се совпаѓаат. Во [Табела 81](#) се резимирани резултатите за совпаѓање од TSO Comprehensive (EU) и методот FISH за фузиите ROS1 и ALK.

Табела 81 Резиме на резултатите за совпаѓање со TSO Comprehensive (EU) и со методот FISH за фузиите ROS1 и ALK

ALK+ROS1	Позитивен со FISH	Негативен со FISH
TSO Comprehensive (EU) Позитивен	3	0
TSO Comprehensive (EU) Негативен	0	44
Вкупно	3	44
Процент на усогласеност	PPA: 100 % (3/3) 95 % CI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % CI: [92 %, 100 %]

Валидност на примерок

Беше измерена валидност на примерок (прв обид) за 181 уникатни примероци РНК и 272 уникатни примероци ДНК од блоковите FFPE чија старост е ≤ 5 години. Овие примероци беа избрани врз основа на типот на ткиво и на расположливиот материјал; валидноста не беше позната. За да се смета една варијанта за важечка, типот на варијантата мора да ги помине мерните показатели за контрола на квалитет на библиотечен материјал. Валидноста на примерокот беше одделно евалуирана за секој тип

варијанта (мали варијанти ДНК/TMB, MSI, амплификација на гени, фузии/сплајс варијанти). Прикажани се во [Табела 82](#). Се предвидува дополнително намалување на валидноста на MSI од 1% за FFPE блокови ≤ 2 години поради испораката на реагенси.

Табела 82 Валидност на примерок

Тип варијанта	Валидност на примерок
Фузии/Сплајс варијанти (РНК)	76%
Мали варијанти ДНК/TMB	75%
MSI	72%
Амплификација на гени	94%

Резиме на аналитичката валидација за тврдењата за профилирање тумор

Врз основа на границата на детекција, прецизноста, повторливоста и точноста на податоците, TSO Comprehensive (EU) е аналитички валидирана за:

- Мали варијанти ДНК—SNV, MNV, како и инсерции и делеции
- TMB
- MSI
- Амплификација на гените MET и ERBB2 (HER2) (Погледнете ја [Табела 2](#)).
- 23 гени за кои може да се детектираат фузии (Погледнете ја [Табела 2](#)).
- Сплајс варијанти на EGFR и MET (Погледнете ја [Табела 2](#)).

Клинички перформанси за NTRK

За да се валидира анализата TSO Comprehensive (EU) како придружна дијагностика (CDx) за изборот на пациенти за третман со VITRAKVI (ларотректиниб), примероци од пациентите вклучени во клиничките испитувања на ларотректиниб (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; заеднички наречени примероци од испитувањата на ларотректиниб) користејќи го последниот датум со податоци заклучно со 15 јули 2019 г., надополнети со комерцијално добиени примероци од FFPE ткиво, беа испитани за да се поткрепат студијата за точноста и клиничката студија за премостување за анализата TSO Comprehensive (EU).

NCT02122913 беше мултицентрична, отворена студија во фаза 1 со зголемување на дозата кај возрасни пациенти со напредни цврсти тумори (сите учесници) кои не биле избрани како пациенти со карцином со позитивна фузија NTRK. По делот од студијата со зголемување на дозата следувааше проширување на дозата за пациентите кај кои е документиран карцином со позитивна фузија NTRK и кај пациентите за кои испитувачот сметал дека можеби би имале придобивки од високоселективниот инхибитор TRK.

NAVIGATE NCT02576431 е тековна, мултицентрична, отворена студија во фаза 2 кај пациенти од 12-годишна возраст и постари, со рекурентни, напредни, цврсти тумори, со документирана фузија NTRK, како што е проценето од надворешна лабораторија. SCOUT NCT02637687 е тековна, мултицентрична, отворена студија во фаза 1/2, кај педијатриски пациенти, од раѓање до 21-годишна возраст, со напредни, цврсти тумори или примарни тумори на централниот нервен систем (ЦНС).

Од пациентите со позитивна фузија NTRK вклучени во студијата за TSO Comprehensive (EU), 164 ја формираа проширената група за примарната ефикасност на ларотректиниб (ePAS4).

Студија на точност за детекција на фузиите NTRK1, NTRK2, NTRK3

Точноста на анализата TSO Comprehensive (EU) за детекција на фузиите NTRK (NTRK1, NTRK2 или NTRK3) кај пациенти со цврсти тумори беше покажана така што се направи процена на резултатите за усогласеноста на фузијата NTRK помеѓу анализата TSO Comprehensive (EU) и валидиран ортогонален метод на база на NGS.

Ретроактивно беше спроведена неинтервенциска студија. Примероци за испитување ларотректиниб, како и дополнителни примероци, беа тестирани на една надворешна локација со анализата TSO Comprehensive (EU) и во централна лабораторија со ортогонален метод. Точноста на анализата TSO Comprehensive (EU) за одредување на фузиите NTRK беше проценета во однос на ортогоналниот метод; беа пресметани позитивната процентуална усогласеност (PPA), негативната процентуална усогласеност (NPA) и придружните двострани интервали на веродостојност од 95% (CI).

Со анализата TSO Comprehensive (EU) и/или со ортогоналниот метод беа испитани вкупно 516 примероци. Од нив, 499 беа испитани со двата методи. Седумнаесет од 516 примероци не беа испитани со една од анализите поради неуспешна екстракција, непозната причина (за ортогоналниот метод) или отстапување од протоколот. Од 499 примероци кои беа испитани со двата методи, 170 (34,1%) беа примероци за испитување ларотректиниб, а 329 (65,9%) беа дополнителни примероци.

Вкрстената табеларност на резултатите за 499 примероци е прикажана во [Табела 83](#). Од 499 примероци, 85 беа со невалидни резултати од анализата TSO Comprehensive (EU); од тие 85, 53 исто така дадоа невалидни резултати со ортогоналниот метод. Дополнителни седум примероци дадоа невалидни резултати со ортогоналниот метод. Следствено на тоа, 407 од 499 примероци дадоа валидни резултати со двата методи.

Табела 83 Студија на точност за NTRK: Вкрстена табеларност на резултатите од TSO Comprehensive (EU) наспроти резултатите од ортогоналниот метод за детекција на фузии NTRK

Резултат од анализата TSO Comprehensive (EU)	Резултати од ортогоналниот метод			
	Позитивна фузија NTRK	Негативна фузија NTRK	Невалиден	Вкупно
Позитивна фузија NTRK	114	16	1	131
Негативна фузија NTRK	4	273	6	283

Резултати од ортогоналниот метод				
Резултат од анализата TSO Comprehensive (EU)	Позитивна фузија NTRK	Негативна фузија NTRK	Невалиден	Вкупно
Невалидни*	4	28	53	85
Вкупно	122	317	60	499

* Невалидните резултати од анализата TSO Comprehensive (EU) беа на ниво на примерок и на ниво на обработка. Анализите за усогласеност, со и без резултати од анализата TSO Comprehensive (EU), се прикажани во Табела 84. Без невалидните резултати од анализата TSO Comprehensive (EU), PPA беше 96,6% (114/118; 95% CI: 91,5% – 99,1%) а NPA беше 94,5% (273/289; 95% CI: (91,2% – 96,8%).

Табела 84 Студија на точност за NTRK: PPA и NPA од анализата TSO Comprehensive (EU) споредени со резултати од ортогоналниот метод за детекција на фузии NTRK

Со исклучок на невалидните резултати од анализата TSO Comprehensive (EU)			Со вклучени невалидни резултати од анализата TSO Comprehensive (EU)	
Мерка за усогласеност	Усогласеност, % (n/N)	95% CI*	Усогласеност, % (n/N)	95% CI*
PPA	96,6 (114/118)	91,5, 99,1	93,4% (114/122)	87,5 – 97,1
NPA	94,5 (273/289)	91,2 – 96,8	86,1 (273/317)	81,8 – 89,7

* 95% CI според (егзактниот) метод Клопер-Пирсон.

Клиничка студија за премостување за детекција на фузиите NTRK1, NTRK2, NTRK3

Клиничката валидност на анализата TSO Comprehensive (EU) за детекција на фузиите NTRK1, NTRK2 или NTRK3 кај пациенти со цврсти тумори кои може да имаат придобивка од третманот со ларотректиниб беше докажана во клиничка студија за премостување. Студијата беше спроведена за да се процени клиничката ефективност на анализата TSO Comprehensive (EU) при идентификацијата на пациенти со позитивна фузии NTRK1, NTRK2 или NTRK3 за третман со ларотректиниб, како и за да се процени совпаѓањето меѓу анализата TSO Comprehensive (EU) и локалните методи на испитување (LT) кои се користат за да се одреди статусот на фузијата NTRK за клиничките испитувања со ларотректиниб).

Методите LT вклучуваа NGS, флуоресцентна хибридизација ин ситу (FISH), верижна реакција на полимераза (PCR) и анализите NanoString. Фузиите NTRK (ETV6 NTRK3) беа изведени кај пациенти со инфантилен фибросарком кај кои има документирана транслокација на ETV6 идентификувана со FISH. Повеќето од 235-те пациенти од испитувањето за ларотректиниб со познат статус за фузија NTRK беа испитани со методите NGS.

Заклучно со 15 јули 2019 г., вклучени беа 279 пациенти. Од тие 279 пациенти, 208 имаа позитивна фузија NTRK. Од 208-те позитивни пациенти, 164 ја формираа ларотректиниб ePAS4.

Примарната крајна точка за анализа на ефикасноста на ларотректиниб беше севкупната стапка на одговор (ORR) според процената на независниот комитет за ревизија (IRC) во сет групирани податоци од три клинички студии. Процената на ORR се правеше врз основа на соодносот на пациентите со најдобар севкупен одговор на потврден целосен одговор или потврден делумен одговор за критериумите од RECIST, верзија 1.1. ORR кај ларотректиниб ePAS4 изнесуваше 72,6% (95% CI [65,1%, 79,2%]) и опфаќаше пациенти со 16 различни типови тумор.

Отчетност за примероците

Сетот примероци беше репрезентативен за широк спектар типови тумор и вклучуваше примероци од педијатриски и возрасни пациенти.

Заклучно со 15 јули 2019 година, во студиите со ларотректиниб биле вклучени вкупно 279 пациенти. Од нив, кај 235 пациенти бил познат статусот за фузијата NTRK, одредена со методот LT: 208 биле позитивни, а 27 негативни. Кај 44 пациенти, статусот за фузијата NTRK бил непознат, бидејќи испитувањето не било задолжително за да се одреди подобноста на пациентот во фазите на зголемување на дозата во студиите NCT02122913 и SCOUT NCT02637687. За клиничката студија за премостување на анализата TSO Comprehensive (EU) биле подобни примероците од пациентите вклучени во испитувањето на ларотректиниб заклучно со 15 јули 2019 година, а кои имале познат статус на фузијата NTRK (208 позитивни и 27 негативни пациенти), како и дополнителните примероци кај кои со репрезентативни методи LT било утврдено дека фузијата NTRK е негативна.

Од 208 позитивни примероци од испитувањето на ларотректиниб, 154 биле достапни за испитување со анализата TSO Comprehensive (EU). Од нив, резултатите од 138 примероци биле валидни. Петнаесет примероци биле невалидни поради тоа што не ги поминале мерните показатели за контрола на квалитет за секвенционирање примерок, а 1 примерок не бил испитан поради отстапување од протоколот. Од 27 негативни примероци од испитувањето на ларотректиниб, за 24 имало примерок достапен за испитување. Од нив, резултатите од анализата TSO Comprehensive (EU) на 22 примероци биле валидни. Два примерока биле невалидни поради тоа што не ги поминале мерните показатели за контрола на квалитет за секвенционирање примерок.

Бил направен скрининг на дополнителните примероци со помош на еден од двата репрезентативни методи LT. Биле набавени над 350 примероци кај кои било испитано дали има содржина на тумор. Од дополнителните примероци кои ги исполнувале барањата за примерок, 266 биле успешно екстрахирани и било потврдено дека се негативни за фузијата NTRK по пат на репрезентативен метод LT. Од нив, 260 биле достапни за испитување со анализата TSO Comprehensive (EU), при што од 222 примерока имало валидни резултати. 38 примероци биле невалидни поради тоа што не ги поминале мерните показатели за контрола на квалитет за секвенционирање примерок (n = 25) или, пак, обработката со секвенционирање не била успешна (n = 13). Целиот сет со негативна фузија NTRK се состоел од 222 дополнителни примерока и 22 примерока од испитувањето на ларотректиниб.

Резултати за совпаѓање

Севкупно, имаше 437 примероци тестирани со TSO Comprehensive (EU). Меѓу 208 пациенти со позитивна фузија NTRK, за 153 имаше достапни примероци и тие беа тестирани со TSO Comprehensive (EU), при што се добија 138 валидни резултати и 15 невалидни резултати.

Совпаѓањето на резултатите од TSO Comprehensive (EU) во однос на резултатите од методите LT, со и без невалидните резултати од TSO Comprehensive (EU), е прикажано во [Табела 85](#).

Табела 85 Клиничка студија за премостување за NTRK: Совпаѓање помеѓу анализата TSO Comprehensive (EU) и методите LT за детекција на фузиите NTRK

Мерка за усогласеност	Со исклучок на невалидните резултати од анализата TSO Comprehensive (EU)		Со вклучени невалидни резултати од анализата TSO Comprehensive (EU)	
	% усогласеност (n/N)	95% CI*	% усогласеност (n/N)	95% CI*
PPA	89,1 (123/138)	82,7, 93,8	80,4 (123/153)	73,2, 86,4
NPA	96,3 (235/244)	93,1, 98,3	82,7 (235/284)	77,8, 87,0
OPA	93,7 (358/382)	90,8, 95,9	81,9 (358/437)	78,0, 85,4

* Двостраните CI од 95% се пресметани со помош на (егзактниот) метод Клувер-Пирсон.

Со анализата за чувствителност во споредба со резултатите од анализата TSO Comprehensive (EU) кои недостигаат се покажа робусноста на анализата на усогласеност. Резултатите кои недостигаат од анализата TSO Comprehensive (EU) за фузијата LT NTRK кај пациентите со позитивни резултати (n = 70) се внесени со помош на моделот за логистичка регресија. Процените на усогласеноста, заедно со припишаните вредности се прикажани во [Табела 86](#).

Табела 86 Клиничка студија за премостување за NTRK: Совпаѓање помеѓу анализата TSO Comprehensive (EU) и методите LT за детекција на фузиите NTRK, заедно со внесените резултати за пациенти со позитивна LT со резултати кои недостигаат од анализата TSO Comprehensive (EU)

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

Не се импутирани резултатите кои недостигаат од анализата TSO Comprehensive (EU) за пациенти негативни на LT фузија.

* Двостраните интервали на веродостојност од 95% се пресметани со помош на методот Boot со повеќекратна импутација. Методот Boot со повеќекратна импутација е почетен чекор кој се наоѓа во повеќекратната импутација (Schomaker and Neumann 2018).

Усогласувањата помеѓу анализата TSO Comprehensive (EU) и LT според типот на методот (на пример RNA NGS, FISH) се прикажани во [Табела 87](#).

Табела 87 Клиничка студија за премостување за NTRK: Совпаѓање помеѓу анализата TSO Comprehensive (EU) и методите LT за детекција на фузиите NTRK според типот на методите LT

LT тип на метод	Мерка за усогласеност	% усогласеност (n/N)	95% CI ¹
DNA NGS	PPA	84,2 (32/38)	(68,7, 94,0)
	NPA	88,9 (16/18)	(65,3, 98,6)
	OPA	85,7 (48/56)	(73,8, 93,6)
RNA NGS ²	PPA	91,5 (75/82)	(83,2, 96,5)
	NPA	96,9 (218/225)	(93,7, 98,7)
	OPA	95,4 (293/307)	(92,5, 97,5)
FISH	PPA	80,0 (8/10)	(44,4, 97,5)
	NPA	Не е пресметано (1/1)	Не е пресметано
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Не е пресметано (0/0)	Не е пресметано
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Не е пресметано: статистиката за усогласеност не е пресметана за подгрупи чиј број примероци е < 5.

¹ Двостраните интервали на веродостојност од 95% се пресметани со помош на (егзактниот) метод Клопер-Пирсон.

² Опфатени се методите NGS за кои се користи само РНК, како и оние за кои се користат РНК и ДНК.

Од 437-те примероци испитани со анализата TSO Comprehensive (EU), 24 имаа резултати кои не се совпаѓаа со оние од LT: 15 беа позитивни според LT, а негативни според анализата TSO Comprehensive (EU), додека пак 9 беа негативни според LT и позитивни според анализата TSO Comprehensive (EU). Од 24-те примероци со резултати кои не се совпаѓаат, 8 беа испитани со методот DNA NGS LT, 14 со методот RNA NGS LT и 2 беа испитани со FISH.

Со валиден независен метод за NGS кај 14 од 24 примероци со резултати кои не се совпаѓаат, беа потврдени резултатите од анализата TSO Comprehensive (EU). За останатите 10 примероци, резултатите од анализата TSO Comprehensive (EU) не се совпаѓаа и со оние од методот LT и од независниот метод за NGS.

Резултати од клиничка ефикасност

Во рамките на групата ePAS4, ефикасноста на ларотректиниб кај популацијата со позитивна TSO Comprehensive (EU), со позитивна LT (97 пациенти, ORR=78,4%, 95% CI [68,8%, 86,1%]) беше слична на ефикасноста на ларотректиниб кај вкупната популација во ePAS4 (164 пациенти, ORR=72,6%, 95% CI [65,1%, 79,2%]) (Табела 88). Од 97 пациенти со позитивна TSO Comprehensive (EU) во ePAS4, кај 28 (28,9%) пациенти беше постигнат целосен одговор/целосен хируршки одговор, а кај 48 (49,5%) пациенти беше постигнат делумен одговор.

Од 13 пациенти со негативна TSO Comprehensive (EU), популација со позитивна LT, кај 1 пациент (7,7%) имаше целосен одговор, а кај 2 (15,4%) делумен одговор на терапијата со ларотректиниб.

Табела 88 Клиничка студија за премостување за NTRK: ORR кај пациентите со позитивна LT според резултатите од LT и TSO Comprehensive (EU) во ePAS4

		Позитивна фузија LT N=164	TSO Comprehensive (EU) Позитивна и LT N=97	TSO Comprehensive (EU) Негативна и LT N=13
Најдобар свкупен одговор, n (%)	Целосен одговор	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Целосен хируршки одговор	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Делумен одговор	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Стабилна болест	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Прогресивна болест	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Не може да се евалуира	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Свкупна стапка на одговор	Број на пациенти, n	164	97	13
	Број на пациенти со CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (95% CI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Кратенки: CR = Целосен одговор, PR = Делумен одговор, sCR = Целосен хируршки одговор.

* Двостраниот интервал на веродостојност од 95% е пресметан со помош на (егзактниот) метод Клопер-Пирсон. За 54 пациенти недостигаа резултатите од анализата TSO Comprehensive (EU).

Податоците од оваа студија ги поткрепуваат безбедноста и ефективноста на анализата TSO Comprehensive (EU) кога се користи за да се идентификуваат пациенти со цврсти тумори со фузија NTRK кои може да бидат подобни за третман со ларотректиниб.

Референци

1. Американско здружение за клиничка онкологија. www.asco.org. Пристапено на 3 октомври 2016 г.
2. Европско здружение за медицинска онкологија. www.esmo.org. Пристапено на 3 октомври 2016 г.

Претходни ревизии

Ревизија	Датум	Опис на измената
Бр. на документ 200007789 v08	Мај 2025 г.	Отстранета е референцата за верзии на софтвер и броеви на делови. Ажурирани ограничувања на процедура: - Информации за некротично ткиво. - Информации за содржината на туморот на MSI. Ажурирано: - Фуснотата на NTC да се примени и на минималните и на максималните библиотеки. - Листа на опрема и материјали, спецификации на центрифугата на плочата и инкременти на пипетите. - Пресметка на вишок на SPB од 1,05x до 1,15x. - Терминологија за MET егзон 14 del до испуштање MET егзон 14. Додадено: - Белешка за SMB во Зафаќање на цели еден и два. - Подгответе се за вовед во секвенционирањето. - Дополнителни информации за ултразвучникот. Додадени појаснувања и ажурирани резултати за карактеристиките на перформансите: - Супстанции кои го попречуваат процесот. - Точност за профилирање на туморот и валидност на примерокот. - Студија за граница на детекција 1 и 2. - Студија 1 за внатрешно лабораториска прецизност. - Студија за репродуктивност 2. - Стабилност на библиотеката и информации за складирање во библиотеката. - Граница на празен примерок. Ажуриран јазик и граматика.

Ревизија	Датум	Опис на измената
Бр. на документ 200007789 v07	Јануари 2024 г.	- Додадени информации кон Ограничувања на процедурата: - Барања за примерок од некротично ткиво и содржина на тумор за мутации со високо ниво на MSI и мутации на соматски варијанти кои поттикнуваат развој. - Потенцијални пречки од хемоглобинот. - Ограничувања за детекција на генот RET и одредување фузии надвор од означените граници на генот. - Не се пријавени делеции на гените. - Ажурирано за употреба со софтверот верзија 2.3.7 за TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager. - Додадени информации за потребната, но недоставена опрема и материјали, како и за две дополнителни конфигурации на ултразвучен апарат. - Ажурирани информации за примероците: - Содржина на некротично ткиво. - Ефекти на протеиназата K и хемоглобинот. - Складирање нуклеинска киселина FFPE поставена на предметно стакло и прочистена. - Додадени информации за подобрување на неуспешното ракување со реагенсот, работниот тек и решавањето проблеми при извршувањето на контролата на квалитетот. - Додаден контекст и разјаснување на карактеристиките на перформансите: - Вкрстена контаминација - Евалуација на комплетот за екстракција на нуклеинска киселина - Супстанции кои го попречуваат процесот - Стабилност на нуклеинска киселина и FFPE поставена на предметно стакло - Клинички перформанси за NTRK - Ажуриран јазик и граматика

Ревизија	Датум	Опис на измената
Бр. на документ 200007789 v06	Февруари 2023 г.	- Дополнителни изјави во делот за Ограничувања - Јазични ажурирања во поглед на начинот на изразување, граматиката и разбирливоста - Корекција на табелите 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 - Изјава за присуство на талог кај реагенсот FSM - Ажурирани спецификации за термоциклер и пластично коритце во листата со Опрема и материјали
Бр. на документ 200007789 v05	Септември 2022 г.	Ажурирани табели за Студијата 2 за повторливоста
Бр. на документ 200007789 v04	Јуни 2022 г.	- Додаден модул за анализата TSO Comprehensive v2.3.5 PNs - Избришан модул за анализата TSO Comprehensive v2.3.3 PNs - Ажурирана терминологија во делот Граница на празен примерок
Бр. на документ 200007789 v03	Април 2022 г.	- Додадени информации за карактеристики на перформансите кои се однесуваат на фузиите NTRK - Додадена ознака CAMO 3A ИЗВОЗ - Ажурирана изјава за предвидената примена, со која се додава тврдењето за NTRK1-3 CDx - Проширени информации за компонентите на производот за да се вклучат и софтверските компоненти PN
Бр. на документ 200007789 v02	Февруари 2022 г.	- Коригирана грешка во упатување на табела - Додадено ограничување кое се однесува на герминативните и соматските варијанти - Појаснет јазикот кој се однесува на детекцијата на амплификација на гени
Бр. на документ 200007789 v01	Декември 2021 г.	- Ажурирани ограничувања на процедурата - Појаснети спецификации за термоциклер и магнетен држач во листата за Опрема и материјали
Бр. на документ 200007789 v00	Ноември 2021 г.	Прво издание

Патенти и трговски марки

Овој документ и неговата содржина се сопственост на Illumina, Inc. и нејзините филијали („Illumina“) и се наменети исклучиво за договорна употреба од страна на нејзините клиенти во врска со употребата на производите опишани овде и за никаква друга цел. Овој документ и неговата содржина не смеат да се користат или дистрибуираат за никаква друга цел и/или на друг начин да се пренесуваат, обелоденуваат или репродуцираат без претходна писмена согласност од Illumina. Со овој документ Illumina не пренесува никаква лиценца заштитена со патент, трговска марка, авторско право или обичајни и слични права на трети страни.

Квалификуваниот и соодветно обучен персонал мора строго и без никакви отстапки да се придржува до упатствата дадени во овој документ за да се загарантира правилна и безбедна употреба на производите опишани во него. Пред да започнете да ги користите таквите производи, мора да ја прочитате целата содржината на овој документ и да ја разберете.

ДОКОЛКУ НЕ ГИ ПРОЧИТАТЕ ЦЕЛОСНО И НЕ СЕ ПРИДРЖУВАТЕ ДО УПАТСТВОТА ДАДЕНИ ВО ОВОЈ ДОКУМЕНТ, МОЖЕ ДА ДОЈДЕ ДО ОШТЕТУВАЊЕ НА ПРОИЗВОДИТЕ, ПОВРЕДИ НА КОРИСНИЦИТЕ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА И ОШТЕТУВАЊЕ НА ДРУГАТА СОПСТВЕНОСТ, СО ШТО СЕ ПОНИШТУВААТ СИТЕ ГАРАНЦИИ КОИ СЕ ОДНЕСУВААТ НА ПРОИЗВОДИТЕ.

ILLUMINA НЕ ПРЕЗЕМА НИКАКВА ОДГОВОРНОСТ ЗА ШТЕТИТЕ КОИ НАСТАНАЛЕ ПОРАДИ НЕПРАВИЛНА УПОТРЕБА НА ПРОИЗВОДИТЕ КАКО ШТО Е ОПИШАНО ОВДЕ (ВКЛУЧУВАЈЌИ ГИ И НИВНИТЕ ДЕЛОВИ ИЛИ СОФТВЕР).

© 2025 Illumina, Inc. Сите права се задржани.

Сите трговски марки се сопственост на Illumina, Inc. или на нивните соодветни сопственици. Конкретни информации за трговските марки побарајте на www.illumina.com/company/legal.html.

Информации за контакт



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 САД
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (надвор од Северна Америка)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE

IVD



Означување производ

Сите симболи кои се појавуваат на пакувањето и етикетата од производот, можете да ги најдете во легендата на support.illumina.com во картичката *Documentation* (Документација) за вашиот комплет.