

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

Ulotka dołączona do opakowania

DO STOSOWANIA W DIAGNOSTYCE IN VITRO. WYŁĄCZNIE NA EKSPORT.

Przeznaczenie

TruSight™ Oncology Comprehensive (UE) to test diagnostyczny *in vitro* oparty na celowanym sekwencjonowaniu nowej generacji w celu wykrycia wariantów w 517 genach w próbce kwasów nukleinowych ekstrahowanych z utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE) próbek tkanki nowotworowej pochodzących od pacjentów ze złośliwymi guzami litymi, za pomocą aparatu Illumina® NextSeq™ 550Dx. Test może być wykorzystywany do wykrywania substytucji pojedynczych nukleotydów, wariantów wielonukleotydowych, insercji, delecji i amplifikacji genów w DNA a także fuzji genów i wariantów splicingowych w RNA. Wyniki testów obejmują również raporty dotyczące wskaźnika obciążenia mutacyjnego nowotworu (TMB) i wskaźnika niestabilności mikrosatelitarnej (MSI).

Test jest przeznaczony do diagnostyki towarzyszącej w celu identyfikacji pacjentów z nowotworami do leczenia terapią celowaną wymienioną w [Tabela 1](#), zgodnie z zatwierdzonym oznaczeniem produktu terapeutycznego. Dodatkowo test ma na celu dostarczenie informacji z zakresu profilowania nowotworu wykorzystywanych przez wykwalifikowany personel medyczny zgodnie ze specjalistycznymi wytycznymi i nie jest rozstrzygający ani nie narzuca użycia określonego produktu terapeutycznego z zarejestrowanych wskazań.

Tabela 1 Wskazanie diagnostyki uzupełniającej

Rodzaj nowotworu	Biomarkery	Terapia celowana
Guzy lite	Fuzje genów NTRK1, NTRK2 i NTRK3	VITRAKVI® (larotrekty nib)

Podsumowanie i wyjaśnienie zasady działania testu

Opis kliniczny

Nowotwory są główną przyczyną zgonów na świecie i mogą rozwinąć się w każdej tkance.^{1, 2} Analiza genetycznego podłoża nowotworu złośliwego jest ważna dla identyfikacji pacjentów, którzy mogą odnieść korzyści z terapii celowanych oraz dla opracowania nowych metod leczenia. W pojawienie się lub progresję nowotworów złośliwych zaangażowanych jest wiele genów, a wiele rodzajów raka jest nosicielami różnych wariantów wpływających na te geny i ich funkcje. Warianty mogą wynikać z mutacji genów, takich jak substytucje pojedynczych nukleotydów (SNVs), warianty wielonukleotydowe (MNVs), insercje lub delecje,

amplifikacje genów, fuzje genów i warianty splicingowe. Kolejnym następstwem mutacji genów w nowotworach złośliwych jest obecność neoantygenów, które wywołują swoiste dla raka formy odpowiedzi immunologicznej. Status mutacji raka można przedstawić za pomocą TMB i MSI, które są sygnaturami genomowymi związanymi z prezentacją neoantygenów nowotworowych.

TruSight Oncology Comprehensive jest jakościowym testem służącym do kompleksowego profilowania genomu (CGP) metodą sekwencjonowania nowej generacji (NGS), który pozwala w szerokim zakresie ocenić warianty genomowe w dużym panelu genów związanych z nowotworami, które wymieniono w [Tabela 2](#). Test wykrywa małe warianty 517 genów, a także amplifikacje genów, fuzje i warianty splicingowe, jak wskazano w [Tabela 2](#). Test zapewnia pokrycie sekwencji kodującej wszystkich genów z wyjątkiem TERT, w przypadku którego pokrywany jest tylko region promotora, i wskazuje wartość TMB oraz MSI. Te cele badań uwzględniają treści cytowane przez organizacje zawodowe i inne najważniejsze amerykańskie wytyczne. Na strukturę testu TSO Comprehensive wpłynęły również niezależne publikacje konsorcjów i badania farmaceutyczne prowadzone na późnym etapie.

Lista obszarów wyłączonych z analizy wariantów podana jest w *TruSight Oncology Comprehensive Block List* (nr dok. 200009524) dostępnym w [witrynie pomocy](#) Illumina.

W [Tabela 2](#) przedstawiono następujące kategorie wariantów: Mały wariant DNA (S), amplifikacja genu (A), fuzja (F) i wariant splicingowy (Sp). Małe warianty DNA to SNV, MNV, insercje i delecje.

Tabela 2 TSO Comprehensive (EU) Panel genowy testu

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

Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu	Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu	Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu
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	BTX	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S

Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu	Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu	Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S

Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu	Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu	Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu
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
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

Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu	Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu	Lp.	Entrez ID	Gen	Rodzaj wariantu
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	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.

Zasada procedury

Test TSO Comprehensive (EU) jest testem rozproszonym, który przeprowadza się ręcznie przy użyciu ekstrahowanych kwasów nukleinowych jako materiału wejściowego. DNA i/lub RNA ekstrahowany z tkanki utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie (FFPE) jest wykorzystywany do przygotowania bibliotek, które są następnie wzbogacane w sekwencje genów związanych z -nowotworami i sekwencjonowane na aparacie Aparat NextSeq 550Dx.

Test TSO Comprehensive (EU) obejmuje następujące procesy.

- **Przygotowanie i wzbogacanie bibliotek** – 40 ng całkowitego RNA jest przekształcane do dwuniciowego komplementarnego DNA (cDNA). W przypadku genomowego DNA (gDNA) 40 ng gDNA jest dzielone na małe fragmenty. Uniwersalne adaptory do sekwencjonowania są poddawane ligacji z fragmentami cDNA i gDNA. Sekwencje adaptera P5 i P7 są włączane do każdej biblioteki, aby umożliwić wychwytywanie fragmentów biblioteki na powierzchnię komory przepływowej podczas sekwencjonowania. Adaptory zawierają sekwencje indeksujące i5 oraz i7 identyfikujące każdą pojedynczą próbkę oraz, w przypadku bibliotek z próbek gDNA, pojedyncze cząsteczki z użyciem unikalnych identyfikatorów molekularnych (UMI). Biblioteki są następnie wzbogacane pod względem określonych genów będących przedmiotem zainteresowania z użyciem metody opartej na wychwytywaniu. Biotynylowane sekwencje sond, które obejmują regiony genów będące przedmiotem zainteresowania, na które ukierunkowany jest test, są hybrydizowane do bibliotek. Sondy i zhybrydizowane biblioteki docelowe są wyodrębniane od bibliotek niedocelowych przez wychwytywanie za pomocą kulek magnetycznych powlekanych streptawidyną. Docelowe wzbogacone biblioteki są płukane i poddawane amplifikacji. Ilość każdej wzbogaconej biblioteki jest następnie normalizowana przy użyciu metody zależnej od nośnika, aby zapewnić równą reprezentację w spulowanych bibliotekach do sekwencjonowania.
- **Sekwencjonowanie i analiza podstawowa** – znormalizowane, wzbogacone biblioteki są pulowane i łączone w klastry w komorze przepływowej, a następnie sekwencjonowane za pomocą technologii sekwencjonowania przez syntezę (SBS) w NextSeq 550Dx. W technologii SBS stosowana jest metoda odwracalnego terminatora służąca do wykrywania pojedynczych znakowanych fluorescencyjnie trójfosforanów deoksyrybonukleotydów (dNTP) w miarę ich wbudowywania do rosnących łańcuchów DNA. Podczas każdego cyklu sekwencjonowania do łańcucha kwasów nukleinowych dodawany jest pojedynczy dNTP. Etykieta dNTP służy jako terminator polimeryzacji. Po każdym wbudowaniu dNTP barwnik fluorescencyjny jest obrazowany w celu identyfikacji nukleotydu, a następnie oddzielany, aby umożliwić wprowadzenie kolejnego nukleotydu. Wszystkie cztery dNTP (A, G, T, C) związane z terminatorem odwracalnym występują jako pojedyncze, osobne cząsteczki. W rezultacie naturalna konkurencja minimalizuje błąd systematyczny wynikający z wprowadzania nukleotydów. Podczas analizy podstawowej rozpoznawanie nukleotydów odbywa się bezpośrednio na podstawie pomiarów natężenia sygnału podczas kolejnych cykli sekwencjonowania. Do każdego rozpoznania nukleotydu przypisywany jest wynik jakościowy.
- **Analiza drugorzędowa** – Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module znajduje się w aparacie NextSeq 550Dx jako część oprogramowania Local Run Manager, aby ułatwić konfigurację przebiegu TSO Comprehensive (EU) i wykonywanie analizy drugorzędowej wyników

sekwencjonowania. Analiza drugorzędowa obejmuje walidację przetwarzania przebiegu i kontrolę jakości, a następnie demultipleksowanie, generowanie pliku FASTQ, dopasowanie i rozpoznawanie wariantów. Demultipleksowanie powoduje oddzielenie danych od spulowanych bibliotek w oparciu o niepowtarzalne indeksy sekwencji dodane podczas procedury przygotowania biblioteki. Generowane są pośrednie pliki FASTQ, które zawierają odczyty sekwencjonowania poszczególnych próbek oraz oceny jakościowe z wyłączeniem odczytów z klastrów, które nie przeszły przez filtr. Odczyty sekwencjonowania są następnie dopasowywane do genomu referencyjnego w celu określenia relacji między sekwencjami. Przydzielana jest także ocena jakościowa na podstawie regionów podobieństwa. Dopasowane odczyty są zapisywane do plików w formacie BAM. Oprogramowanie testu wykorzystuje oddzielne algorytmy dla bibliotek generowanych z próbek DNA i/lub RNA w celu rozpoznania małych wariantów DNA, amplifikacji genów, TMB i MSI dla próbek DNA oraz fuzji i wariantów splicingowych dla próbek RNA. Moduł oprogramowania do analizy generuje wiele danych wyjściowych, w tym metryki sekwencjonowania oraz pliki w formacie VCF (Variant Call Format). Pliki VCF zawierają informacje o wariantach znalezionych w określonych pozycjach w genomie referencyjnym. Dla każdej próbki generowane są metryki sekwencjonowania oraz indywidualne pliki wyjściowe. Szczegółowe informacje na temat analizy drugorzędowej i trzeciorzędowej można znaleźć w *Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (nr dokumentu: 200008661)*.

- **Analiza trzeciorzędowa** – analiza trzeciorzędowa, wykonywana przez Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module, składa się z obliczeń TMB i MSI, rozpoznawania diagnostyki uzupełniającej, profilowania wariantów nowotworu do dwóch poziomów istotności klinicznej przy użyciu biblioteki wiedzy (KB) i typu tkanki oraz z generowania raportu wyników. Profilowanie nowotworu można również określić mianem kompleksowego profilowania genomu. Zinterpretowane wyniki dotyczące wariantów oraz wyniki dotyczące biomarkerów TMB i MSI są podsumowane w raporcie wyników TSO Comprehensive (EU).

Ograniczenia dotyczące procedury

Wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.

- Wyłącznie do użytku z przepisu lekarza. Test należy stosować zgodnie z przepisami obowiązującymi laboratoria kliniczne.
- Wyniki badania genomu wymienione w [Tabela 2](#) dotyczącej przeznaczenia nie narzucają opisanego na etykiecie użycia jakiegokolwiek konkretnego produktu terapeutycznego ani o nim nie rozstrzygają.
- W przypadku wariantów wymienionych w raporcie wyników testu TSO Comprehensive (EU) w punkcie Wyniki badania genomu o potwierdzonym znaczeniu klinicznym (poziom 2) i Wyniki badania genomu o potencjalnym znaczeniu klinicznym (poziom 3) nie przeprowadzono walidacji klinicznej.
- Decyzje dotyczące opieki nad pacjentem i jego leczenia muszą być podejmowane w oparciu o niezależny osąd lekarza prowadzącego, z uwzględnieniem wszystkich stosownych informacji dotyczących stanu pacjenta, takich jak historia choroby i wywiad rodzinny, badanie przedmiotowe, informacje z innych badań diagnostycznych oraz preferencje pacjenta, zgodnie ze standardem opieki w danej społeczności.

- Jakość próbek FFPE jest bardzo zmienna. Przypuszczalnie z próbek, których nie poddano standardowym procedurom utrwalania, nie będzie możliwa ekstrakcja kwasów nukleinowych spełniających wymagania kontroli jakości testu ([Kontrola jakości na stronie 85](#)). Błoczki FFPE, które były przechowywane okres dłuższy niż pięć lat, charakteryzowały się niższą przydatnością.
- Nie oceniano działania testu TSO Comprehensive (EU) w próbkach pobranych od pacjentów po przeszczepie narządu lub tkanki.
- Duża ilość tkanki martwiczej ($\geq 23\%$) może zakłócać zdolność testu TSO Comprehensive (EU) do wykrycia amplifikacji genowych i fuzji RNA.
- Somatyczne mutacje kierujące mogą nie zostać wykryte w sposób wiarygodny, jeśli zawartość komórek nowotworowych (według obszaru) jest mniejsza niż 20%.
- Wynik stabilności mikrosatelitarnej (MS-Stable) może być niewiarygodny, jeśli zawartość komórek nowotworowych jest mniejsza niż 30%. Wynik MSI-High jest poprawny niezależnie od zawartości komórek nowotworowych.
- Hemoglobina związana z tkanką zmniejsza odczyty potwierdzające dla wariantów splicingowych MET.
- W genomach o dużym stopniu rearanżacji z delecjami i utratą heterozygotyczności oprogramowanie TSO Comprehensive (EU) może błędnie zaklasyfikować próbkę DNA jako zanieczyszczoną (CONTAMINATION_SCORE > 3106 i P_VALUE $> 0,049$).
- Wynik ujemny nie wyklucza obecności mutacji w ilości poniżej granicy wykrywalności (LoD) testu.
- Na czułość wykrywania małych wariantów DNA mogą wpływać:
 - Kontekst genomowy o niskiej złożoności.
 - Rosnąca długość wariantu.
- Wyniki TMB mogą być niedokładne w następujących kontekstach:
 - Kiedy zawartość komórek nowotworowych osiągnie poziom, przy którym częstości allelu wariantu (VAF) linii germinjalnej i somatycznej zbiegają się.
 - W populacjach niereprezentowanych odpowiednio w publicznych bazach danych.
- Amplifikacje genowe są jedynymi wariantami liczby kopii zgłoszonymi przez TSO Comprehensive (EU). Test nie zgłasza delecji genów.
- Algorytmy rozpoznawania fuzji w oprogramowaniu testu TSO Comprehensive (EU) mogą nie uwzględniać potwierdzenia z odczytów, które wykraczają poza granice opisywanego genu.
- Na czułość wykrywania fuzji mogą wpływać:
 - Mała złożoność biblioteki prowadząca do zmniejszenia liczby odczytów potwierdzających z powodu odstępstw od procedury testu (np.: na etapach mieszania w punkcie [Denaturacja RNA i przyłączanie starterów na stronie 45](#)).
 - Sytuacje, gdy pojedynczy gen obejmuje oba miejsca pęknięcia.
 - W przypadkach, gdy kilka miejsc pęknięcia fuzji znajduje się blisko siebie z jednym lub wieloma partnerami, wiele miejsc pęknięcia i partnerów może być zgłaszanych jako jedno miejsce pęknięcia i partner.

- Małe mediany rozmiarów insertów. Wymagana jest minimalna mediana rozmiaru insertu wynosząca 80 bp, ale czułość zmniejsza się w zakresie 80–100 bp.
- Niska złożoność sekwencji lub homologiczny kontekst genomowy wokół miejsc pęknięcia fuzji.
- Wpływ na rozdzielczość genów zaangażowanych w fuzję może wystąpić, gdy miejsca pęknięcia fuzji występują w regionach genomowych zawierających nakładające się geny. Jeśli wiele genów nakłada się na miejsce pęknięcia, test wskaże wszystkie geny, oddzielając je średnikami.
- Niespójne pokrycie w regionie promotora TERT może skutkować brakiem wyniku z powodu małej głębokości.
- Adnotacje lub błędy biblioteki KB mogą spowodować wynik fałszywie dodatni lub fałszywie ujemny, w tym umieszczenie wariantu na niewłaściwym poziomie (między wynikami badania genomu o potwierdzonym znaczeniu klinicznym [poziom 2] i wynikami badania genomu o potencjalnym znaczeniu klinicznym [poziom 3]) lub informacje o adnotacji w raporcie mogą być nieprawidłowe. Na warianty zgłoszone w wynikach CDx nie mają wpływu adnotacje ani błędy KB. Możliwe błędy mogą pochodzić z następujących trzech źródeł:
 - Adnotacja wariantu TSO Comprehensive (EU). Częstość występowania błędów wynosi mniej więcej 0,0027% w oparciu o analizę 2 448 350 wariantów z bazy danych COSMIC v92, dlatego prawdopodobieństwo błędu jest niewielkie.
 - Błąd biblioteki KB ze względu na proces selekcji.
 - Ważność zawartości biblioteki KB zmienia się w czasie. Ten raport odzwierciedla stan wiedzy w momencie, w którym wybrano wersję KB.
- Test TSO Comprehensive (EU) jest przeznaczony do zgłaszania wariantów somatycznych wraz ze zgłaszaniem wariantów o potwierdzonym znaczeniu klinicznym lub wariantów o potencjalnym znaczeniu klinicznym. W badaniu obejmującym tylko nowotwór możliwe jest raportowanie wariantów linii germinalnej (dziedzicznych), ale nieumyślne. TSO Comprehensive (EU) wykorzystuje KB do raportowania wariantów bez wyraźnej adnotacji, czy pochodzą one z linii germinalnej czy somatycznej.
- Biblioteka KB zawiera tylko powiązania terapeutyczne, diagnostyczne i prognostyczne, które są istotne dla wariantów obecnych w ustalonej liście, złośliwej zmianie nowotworowej. Powiązania z podatnością lub ryzykiem rozwoju nowotworu nie są uwzględniane w bibliotece KB.
- W poniższej tabeli przedstawiono zmiany nukleotydów dla trzech wariantów RET, których nie można wykryć w teście. Można wykryć inne zmiany nukleotydów dla tej samej zmiany aminokwasów.

Tabela 3 Zmiany nukleotydów dla trzech wariantów RET

Zmiana aminokwasu	Chr*	Pozycja	Allel referencyjny	Alternatywa
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 = chromosom

Elementy produktu

Test TSO Comprehensive (EU) składa się z następujących elementów:

- Zestaw TruSight Oncology Comprehensive (EU) (nr kat. 20063092 Illumina) – zawiera odczynniki o wystarczającej objętości do wygenerowania 24 bibliotek DNA i 24 bibliotek RNA. Obejmuje to pochodzące od pacjenta próbki i kontrole. Kontrole sprzedawane są oddzielnie (patrz [Odczynniki wymagane, ale niedostarczane na stronie 18](#)).
- Biblioteka Knowledge Base: regularnie aktualizowana i dostępna do pobrania na portalu Illumina Lighthouse Portal.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (numer kat. 20051843 Illumina), który obejmuje następujące elementy:
 - Pakiety reklamacji TSO Comprehensive
 - Pakiet oprogramowania TSO Comprehensive
 - Zestaw USB TSO Comprehensive

Przedstawiciel serwisu Illumina instaluje odpowiednią wersję Modułu analityczny TSO Comprehensive (EU) na Local Run Manager Aparat NextSeq 550Dx. Szczegółowe informacje na temat modułu analitycznego można znaleźć w Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (nr dokumentu: 200008661).

Odczynniki

Dostarczane odczynniki

Z zestawem testu TSO Comprehensive (EU) dostarczane są następujące odczynniki.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, nr kat. 20031127

Odczynnik	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Składniki aktywne	Temperatura przechowywania
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający sole i nukleotydy	Od -25°C do -15°C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający sole, polimerazę DNA, RNazę H i nukleotydy	Od -25°C do -15°C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający sole i losowe heksamery	Od -25°C do -15°C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający odwrotną transkryptazę (reverse transcriptase)	Od -25°C do -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), nr kat. 20031118

Odczynnik	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Składniki aktywne	Temperatura przechowywania
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający polimerazę DNA faga T4 i kinazę polinukleotydową	Od -25°C do -15°C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający sole i nukleotydy	Od -25°C do -15°C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole	Od -25°C do -15°C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający ligazę	Od -25°C do -15°C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający uniwersalne oligonukleotydy służące do sekwencjonowania	Od -25°C do -15°C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający uniwersalne oligonukleotydy służące do sekwencjonowania	Od -25°C do -15°C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający sole	Od -25°C do -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający polimerazę DNA i nukleotydy	Od -25°C do -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), nr kat. 20031119

Odczynnik	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Składniki aktywne	Temperatura przechowywania
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole	Od 2°C do 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Roztwór wodny zawierający kulki magnetyczne.	Od 2°C do 8°C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Roztwór Tris EDTA	Od 2°C do 8°C

Startery indeksujące TruSight Oncology Comp UP, nr kat. 20031120

Składniki aktywne: buforowany roztwór wodny zawierający oznaczone indywidualnymi kodami kreskowymi startery oligonukleotydowe.



PRZESTROGA

Starterów indeksujących Unique Index Primers (UPxx) należy używać w przypadku próbek RNA lub DNA. Nie łączyć starterów indeksującym CPxx i UPxx w tej samej bibliotece.

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

Startery indeksujące TruSight Oncology Comp CP, nr kat. 20031126

Składniki aktywne: buforowany roztwór wodny zawierający oznaczone indywidualnymi kodami kreskowymi startery oligonukleotydowe.



PRZESTROGA

Starterów do indeksowania Combinatorial Index Primers (CPxx) wolno używać wyłącznie w przypadku próbek DNA. Nie łączyć starterów indeksującym CPxx i UPxx w tej samej bibliotece.

Starter indeksujący	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Indeks i7	Sekwencjonowanie	Indeks i5	Sekwencjonowanie	Temperatura przechowywania
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	Od -25°C do -15°C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	Od -25°C do -15°C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	Od -25°C do -15°C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	Od -25°C do -15°C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	Od -25°C do -15°C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	Od -25°C do -15°C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	Od -25°C do -15°C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	Od -25°C do -15°C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	Od -25°C do -15°C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	Od -25°C do -15°C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	Od -25°C do -15°C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	Od -25°C do -15°C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	Od -25°C do -15°C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	Od -25°C do -15°C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	Od -25°C do -15°C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	Od -25°C do -15°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), nr kat. 20031123

Odczynnik	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Składniki aktywne	Temperatura przechowywania
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający formamid i sole	Od 2°C do 8°C

Odczynnik	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Składniki aktywne	Temperatura przechowywania
Streptavidin MagBeads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole i kulki paramagnetyczne w fazie stałej kowalencyjnie opłaszczane streptawidyną	Od 2°C do 8°C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Roztwór wodorotlenku sodu	Od 2°C do 8°C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Buforowany roztwór wodny	Od 2°C do 8°C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający kulki paramagnetyczne w fazie stałej	Od 2°C do 8°C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole, 2-merkaptotoetanol i formamid	Od 2°C do 8°C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole	Od 2°C do 8°C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole	Od 2°C do 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Roztwór wodny zawierający kulki magnetyczne.	Od 2°C do 8°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), nr kat. 20031121

Odczynnik	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Składniki aktywne	Temperatura przechowywania
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający oligonukleotydy	Od -25°C do -15°C

Odczynnik	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Składniki aktywne	Temperatura przechowywania
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole	Od -25°C do -15°C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający detergent	Od -25°C do -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający polimerazę DNA i nukleotydy	Od -25°C do -15°C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający startery P5 i P7	Od -25°C do -15°C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Buforowany roztwór wodny zawierający sole, 2- merkaptotoetanol i formamid	Od -25°C do -15°C
PhiX Internal Control (PX3 lub PhiX)	20031492	1	10 µl	Buforowany roztwór wodny zawierający genomowe DNA PhiX	Od -25°C do -15°C

Zestaw TruSight Oncology Comp Content Set, nr kat. 20031122

Odczynnik	Numer katalogowy	Ilość	Objętość	Składniki aktywne	Temperatura przechowywania
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Pula sond oligonukleotydowych	Od -25°C do -15°C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Pula sond oligonukleotydowych	Od -25°C do -15°C

Odczynniki wymagane, ale niedostarczane

Odczynniki przed amplifikacją

- Odczynniki do ekstrakcji i oczyszczania DNA i RNA – informacje dotyczące wymagań związanych z odczynnikami zawiera część [Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28](#).
- Odczynniki do ilościowego oznaczania DNA i RNA – informacje dotyczące wymagań związanych z odczynnikami zawiera część [Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28](#).
- Kontrole TruSight Oncology:
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina nr katalogowy 20065041)
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina nr katalogowy 20065042)
- Etanol (EtOH) 100% (ang. 200 proof) do zastosowań w biologii molekularnej
- Woda pozbawiona-RNaz/DNaz

Odczynniki po amplifikacji

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cykli) (nr kat. 20028871 Illumina)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cykli)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cykli)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cykli)
- EtOH, 100% (ang. 200 proof) do zastosowań w biologii molekularnej
- Woda pozbawiona-RNaz/DNaz

Przechowywanie i sposób postępowania z odczynnikami

Następujące opakowania z odczynnikami są wysyłane w stanie zamrożonym. Przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C.

Opakowanie	Numer katalogowy	Obszar laboratorium
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Przed amplifikacją
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Przed amplifikacją

Opakowanie	Numer katalogowy	Obszar laboratorium
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Przed amplifikacją
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Przed amplifikacją
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Po amplifikacji
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Po amplifikacji



PRZESTROGA

Nie przechowywać odczynników w zamrażarkach- bezsronowych ani w przedziałach na drzwiach lodówek.

Poniższe opakowania z odczynnikami są wysyłane z wkładami żelowymi, aby utrzymać temperaturę od 0°C do 10°C. Przechowywać w temperaturze od 2°C do 8°C.

Opakowanie	Numer katalogowy	Obszar laboratorium
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Przed amplifikacją
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Po amplifikacji



PRZESTROGA

Nie zamrażać odczynników zawierających kulki (LNB1, SPB i SMB).

- Zmiany fizycznego wyglądu odczynników mogą wskazywać na pogorszenie się stanu materiałów. Jeśli wystąpią zmiany wyglądu fizycznego (np. zmiany koloru odczynnika lub zmętnienie), nie należy używać odczynników.
- FSM, SSM, ERA1-B i TCB1 mogą zawierać cząstki stałe związane z produktem. Należy przestrzegać specjalnych wytycznych dotyczących postępowania z każdym odczynnikiem. Po wykonaniu etapów mieszania FSM i SSM pozostałe białe cząstki stałe związane z produktem nie będą miały wpływu na wydajność.
- Przeprowadzono ocenę stabilności testu TSO Comprehensive (EU) i wykazano działanie w przypadku maksymalnie czterech zastosowań zestawu. Odczynniki zachowują stabilność do terminu ważności podanego na etykiecie pod warunkiem przechowywania we wskazanych temperaturach.

Sprzęt i materiały

Sprzęt i materiały wymagane, ale niedostarczane

Sprzęt i materiały do zastosowania przed amplifikacją

Wypożyczenie	Dostawca
Homogenizator ultradźwiękowy z akcesoriami Informacje na temat Ustawienia konfiguracji homogenizatora ultradźwiękowego dla fragmentacji DNA na stronie 24.	Ogólny dostawca laboratoryjny
Termocykler o następujących cechach: - Podgrzewana pokrywa z możliwością ustawienia na 30°C i 100°C (lub wyłączenia, jeśli nie można ustawić temperatury 30°C) - Obejmuje zakres temperatur: od 4°C do 99°C - Dokładność pomiaru temperatury: $\pm 0,25^{\circ}\text{C}$ - Kompatybilna z 96-dołkowymi płytkami do PCR, poj. 0,2 ml - Patrz Szybkość spadku/przyrostu temperatury w termocyklerze na stronie 26	Ogólny dostawca laboratoryjny
Wytrząsarka typu wortex	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Inkubatory do mikropłatek (2) z wkładkami grzejnymi na 96-dołkowe płytki MIDI (2)	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Mikrowirówka	Ogólny dostawca laboratoryjny
Wirówka płytkowa o następujących cechach: - Zgodna z 96-dołkowymi mikropłatkami - Osiągalne przyspieszenie $280 \times g$ (+/- 10%)	Ogólny dostawca laboratoryjny
Wytrząsarka płytek o następujących cechach: - Zakres ruchu kołowego 2 mm - Możliwość wytrząsania z prędkością 1200 obr./min i 1800 obr./min	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Klin lub wałek do uszczelniania	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Statyw magnetyczny o następujących parametrach: - Zaprojektowany do precypitacji/separacji kulek paramagnetycznych - Magnes z boku, a nie u dołu, statywu - Zgodny z 96-dołkowymi płytkami MIDI	Ogólny dostawca laboratoryjny

Wypożyczenie	Dostawca
Pipety automatyczne umożliwiające dokładne dostarczanie objętości od 2 µl do 1000 µl o następującej charakterystyce: • Pipeta jedno- lub wielokanałowa z przyrostem 0,02 µl • Pipeta jedno- lub wielokanałowa z przyrostem 0,1 µl, 0,2 µl lub 0,5 µl • Pipeta jedno- lub wielokanałowa z przyrostem 1 µl lub 2 µl Pipety muszą być kalibrowane systematycznie i dokładnie w zakresie 5% podanej objętości.	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Pipetor	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Lód lub blok chłodzący	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Pipety serologiczne o poj. 10 ml	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Samoprzylepna folia uszczelniająca do płytek 96-dołkowych o następujących cechach: • Odklejana • Odpowiednia do płytek do PCR z niskim lub wysokim kołnierzem • Mocny klej, który wytrzymuje wielokrotne zmiany temperatury w zakresie od -20°C do 100°C • Pozbawiona DNaz/RNaz	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Probówki mikrowirownicze o poj. 1,7 ml, pozbawione nukleaz	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Pozbawione nukleaz pojemniki na odczynniki (jednorazowe korytka, poj. 50 ml) (lub równoważne)	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Probówki stożkowe o poj. 15 ml	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Probówki stożkowe o poj. 50 ml	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Kompatybilne końcówki do pipet z filtrem	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
96-dołkowe płytki do przechowywania; poj. dołka 0,8 ml (płytki MIDI)	Fisher Scientific, nr kat. AB-0859 lub odpowiednik
96-dołkowe płytki do PCR kompatybilne z termocyklerem; poj. 0,2 ml (dołki polipropylenowe)	Ogólny dostawca laboratoryjny

Sprzęt i materiały do zastosowania po amplifikacji

Wypożyczenie	Dostawca
Aparat NextSeq 550Dx	Illumina, numer katalogowy 20005715
Wirówka płytkowa o następujących cechach: - Zgodna z 96-dołkowymi mikro płytkami - Osiągalne przyspieszenie 280 × g (+/- 10%)	Ogólny dostawca laboratoryjny
Termocykler o następujących cechach: - Podgrzewana pokrywa (100°C) - Obejmuje zakres temperatur: od 4°C do 99°C - Dokładność pomiaru temperatury: ±0,25°C - Kompatybilna z 96-dołkowymi płytkami do PCR, poj. 0,2 ml - Patrz Szybkość spadku/przyrostu temperatury w termocyklerze na stronie 26	Ogólny dostawca laboratoryjny
Wytrząsarka typu wortex	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Inkubator do mikropórek z wkładką grzejną na 96-dołkowe płytki MIDI	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Suchy blok grzejny o następujących parametrach: - Zakres temperatur: od 25°C do 99°C - Dokładność pomiaru temperatury: ±5°C - Upewnić się, że próbki mikrowirownicze są kompatybilne z blokiem grzejnym	Ogólny dostawca laboratoryjny
Wytrząsarka płytek o następujących cechach: - Zakres ruchu kołowego 2 mm - Możliwość wytrząsania z prędkością 1200 obr./min i 1800 obr./min	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Mikrowirówka	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Klin lub wałek do uszczelniania	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Statyw magnetyczny o następujących parametrach: - Zaprojektowany do precypitacji/separacji kulek paramagnetycznych - Magnesy z boku, a nie u dołu, statywu - Zgodny z 96-dołkowymi płytkami MIDI	Ogólny dostawca laboratoryjny

Wyposażenie	Dostawca
Pipety automatyczne umożliwiające dokładne dostarczanie objętości od 2 µl do 1000 µl o następującej charakterystyce: • Pipeta jedno- lub wielokanałowa z przyrostem 0,02 µl • Pipeta jedno- lub wielokanałowa z przyrostem 0,1 µl, 0,2 µl lub 0,5 µl • Pipeta jedno- lub wielokanałowa z przyrostem 1 µl lub 2 µl Pipety muszą być kalibrowane systematycznie i dokładnie w zakresie 5% podanej objętości.	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Pipetor	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Pipety serologiczne o poj. 10 ml	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Samoprzylepna folia uszczelniająca do płytek 96-dołkowych o następujących cechach: • Odklejana • Odpowiednia do płytek do PCR z niskim lub wysokim kołnierzem • Mocny klej, który wytrzymuje wielokrotne zmiany temperatury w zakresie od -20°C do 100°C • Pozbawiona DNaz/RNaz	Ogólny dostawca laboratoryjny
Probówki mikrowirownicze o poj. 2 ml, pozbawione nukleaz	Ogólny dostawca laboratoryjny
Probówki mikrowirownicze o poj. 1,7 ml, pozbawione nukleaz	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Pozbawione nukleaz pojemniki na odczynniki (jednorazowe korytka, poj. 50 ml) (lub równoważne)	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Probówki stożkowe o poj. 15 ml	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Probówki stożkowe o poj. 50 ml	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Kompatybilne końcówki do pipet z filtrem	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
96-dołkowe płytki do przechowywania; poj. dołka 0,8 ml (płytki MIDI)	Fisher Scientific, nr kat. AB-0859 lub odpowiednik
96-dołkowe płytki do PCR kompatybilne z termocyklerem; poj. 0,2 ml (dołki polipropylenowe)	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych
Lód lub blok chłodzący	Dowolny dostawca sprzętu i materiałów laboratoryjnych

Ustawienia konfiguracji homogenizatora ultradźwiękowego dla fragmentacji DNA

Fragmentacja DNA wpływa na skuteczność testu, określając rozkład wielkości fragmentów, co z kolei wpływa na pokrycie sekwencjonowania. Poddano ocenie i zoptymalizowano na potrzeby testu TSO Comprehensive (EU) kilka konfiguracji skupionych punktowo homogenizatorów ultradźwiękowych ([Tabela 4](#)).

- Czas fragmentacji dostosowano, aby zmaksymalizować metrykę MEDIAN_EXON_COVERAGE opisaną w części [Kontrola jakości na stronie 85](#). Czasy fragmentacji (patrz [Tabela 4](#)) oraz wyniki MEDIAN_INSERT_SIZE różniły się pomiędzy konfiguracjami.
- Konfiguracje 1–4 i 6 badano za pomocą 8-paskowych szklanych probówek. W konfiguracji 5 zastosowano pojedynczą szklaną probówkę. Pojemność probówki przedstawia [Tabela 4](#).
- W optymalizacji konfiguracji 3–6 (mniejsze objętości kąpieli wodnej) wykorzystano pulsację.
- Konfiguracje 3–5 zostały ścięte w mniejszych probówkach. Pojemności probówek wpływają na parametry fragmentacji.
- Konfiguracja 4 (przetwornik liniowy, objętość średniej wielkości kąpieli wodnej, odgazowana woda) wymagała długiego czasu opóźnienia pulsu (40 sekund) w celu uzyskania podobnego MEDIAN_EXON_COVERAGE jak w konfiguracji 1 i 2 przy nominalnej wartości wejściowej 40 ng.
- Optymalne ustawienia konfiguracji 3 spowodowały nieco większy rozkład wielkości fragmentów w porównaniu z innymi konfiguracjami (parametr MEDIAN_INSERT_SIZE był o około 5–10 par nukleotydów większy).
- W konfiguracjach 3 i 5 zastosowano wodę nieodgazowaną i najmniejszą objętość kąpieli wodnej.
- W konfiguracjach 3 i 5 zastosowano wodę nieodgazowaną oraz najmniejsze wielkości kąpieli wodnej i konieczny był w ich przypadku zwiększony poziom wejściowy DNA (50 ng dla konfiguracji 3, 60 ng dla konfiguracji 5), aby można było uzyskać podobną wartość MEDIAN_EXON_COVERAGE w porównaniu do pozostałych 4 konfiguracji, w których stosowano nominalną wartość wyjściową wynoszącą 40 ng.
- Konfiguracje 3 i 5 powodowały większą liczbę uszkodzeń i/lub denaturacji, a zatem dawały mniejszą skuteczną masę cząsteczek dsDNA użytecznych do przygotowania biblioteki.

Odwirować probówki, w których dokonywana jest fragmentacja podczas procesu odzyskiwania, aby zapewnić odzyskanie określonej objętości, ponieważ każda strata materiału może mieć niekorzystny wpływ na działanie testu.

Tabela 4 Oceniane konfiguracje skupionych punktowo homogenizatorów ultradźwiękowych

Parametr	Konfiguracja					
	1	2	3	4	5	6
Przetwornik	Liniowy	Punktowy	Punktowy	Liniowy	Punktowy	Liniowy
Objętość kąpielii wodnej	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Woda odgazowana	Tak	Tak	Nie	Tak	Nie	Tak
System chłodzenia wodą	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak	Tak
Temperatura kąpielii wodnej	7°C	7°C	12°C	12°C	20°C	10°C
Szczytowa moc incydentalna (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
Współczynnik impulsowania (%)	30	10	30	25	20	25
Cykle na impuls	200	200	1000	1000	1000	600
Pulsacja (impulsy 10-sekundowe)	Nie	Nie	Tak	Tak	Tak	Tak
Czas opóźnienia pulsacji	Nd.	Nd.	10 s	40 s	10 s	10 s
Czas fragmentacji	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Przetwarzanie próbki	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Wielkość partii	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Wielkość próbki, probówki szklane łączone w paski (po 8 sztuk)	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Jedna probówka (50 µl)	130 µl (lub 96 płytek mikroTUBE)
Dithering	Nd.	Nd.	Nd.	3 mm Y przy 20 mm/s	Nd.	1,5 mm Y przy 10 mm/s
Odpowiednik wejściowego poziomu DNA (dla mediany pokrycia eksonów)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Czas fragmentacji wynoszący 200 s składa się z 10-sekundowych impulsów w 20 powtórzeniach.

² Czas fragmentacji wynoszący 320 s składa się z 10-sekundowych impulsów w 32 powtórzeniach.

Szybkość spadku/przyrostu temperatury w termocyklerze

Szybkość spadku/przyrostu temperatury w termocyklerze wpływa na parametry kontroli jakości testu (użyteczne miejsca MSI, medianę liczby przedziałów na docelowy wariant CNV, medianę rozmiaru insertu (RNA)) oraz na odczyty potwierdzające dla wariantów splicingowych i fuzji. Zalecana jest optymalizacja szybkości spadku/przyrostu temperatury w termocyklerze. Na przykład testowany model został przestawiony z domyślnej (i maksymalnej) szybkości narastania 5°C/s do 3°C/s, aby uzyskać wyniki porównywalne z innymi modelami o niższych domyślnych szybkościach narastania.

Pobieranie, transport i przechowywanie próbek

Podczas pobierania, transportu, przechowywania i przetwarzania próbek należy postępować zgodnie ze standardowymi procedurami.

Wymagania dotyczące próbek

Tkanka FFPE

Do testu TSO Comprehensive (EU) wymagane jest 40 ng RNA i/lub 40 ng DNA wyekstrahowanego z tkanki FFPE. Wykorzystanie zarówno RNA, jak i DNA umożliwia analizę wszystkich zgłaszanych typów wariantów. Tkankę należy utrwalać przy użyciu utwardzacza zawierającego formalinę odpowiedniego do analiz molekularnych (na przykład 10% buforowanej formaliny o odczynie obojętnym). Tkanki nie wolno odwapniać. Przed wykonaniem testu TSO Comprehensive (EU) próbka tkanki powinna zostać zbadana przez patologa, aby potwierdzić, że jest ona odpowiednia do niniejszego testu. Do wykrycia somatycznych mutacji kierujących wymagana jest zawartość komórek nowotworowych na poziomie co najmniej 20% (na obszar). Wiarygodne wykrywanie statusu MSI w różnych próbkach wymaga co najmniej 30% zawartości komórek nowotworowych. Jeśli próbka o zawartości komórek nowotworowych mniejszej niż 30% poddawana jest testowi w celu określenia wyników dla innych typów wariantów, wynik MS-Stable może być niewiarygodny. Wynik MSI-High jest prawidłowy niezależnie od zawartości komórek nowotworowych.

Odsetek komórek nowotworowych dla amplifikacji genów i wariantów RNA zależy od skali amplifikacji lub ekspresji fuzji (patrz [Odsetek komórek nowotworowych na stronie 112](#)).

W przypadku wysokiego prawdopodobieństwa ekstrakcji 40 ng RNA i 40 ng DNA z różnych typów tkanki stałej zalecana objętość tkanki wynosi $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Objętość ta odpowiada łącznej powierzchni żywej tkanki wynoszącej $\geq 200 \text{ mm}^2$ przy użyciu skrawków grubości $5 \text{ }\mu\text{m}$ lub $\geq 100 \text{ mm}^2$ przy użyciu skrawków grubości $10 \text{ }\mu\text{m}$. Łączny obszar tkanki to suma obszaru żywej tkanki we wszystkich ścinkach dostarczonych do ekstrakcji. Na przykład: łączna powierzchnia tkanki wynosząca 200 mm^2 może zostać uzyskana poprzez ekstrakcję czterech wycinków $5 \text{ }\mu\text{m}$, każdy o powierzchni tkanki 50 mm^2 , lub pięciu wycinków $10 \text{ }\mu\text{m}$, każdy o powierzchni tkanki 20 mm^2 . Martwica tkanki może doprowadzić do uzyskania mniejszej ilości kwasów nukleinowych. Aby zminimalizować prawdopodobieństwo uzyskania wyników fałszywie ujemnych, tkankę można poddać makrodysekcji w celu uzyskania pożądanej zawartości żywych komórek nowotworowych.

Duża ilość tkanki martwiczej ($\geq 23\%$ na obszar) może zakłócać zdolność testu TSO Comprehensive (EU) do wykrycia amplifikacji genowych i fuzji RNA. Jeśli wycinek próbki zawiera więcej niż 23% tkanki martwiczej w całkowitej powierzchni tkanki, tkankę martwiczą należy poddać makrodysekcji. Jeśli w laboratorium przeprowadza się test RNA, należy unikać lub minimalizować ilość tkanki z hemoglobina podczas uzyskiwania wycinków z bloku tkankowego. Patrz [Substancje zakłócające na stronie 103](#).

Tkankę FFPE na szkiełku można przechowywać przez maksymalnie 28 dni w temperaturze pokojowej.

Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych

- Wyekstrahować RNA i DNA z próbek tkanki FFPE za pomocą dostępnych w handlu zestawów ekstrakcyjnych. Różnice pomiędzy zestawami ekstrakcyjnymi mogą wpływać na wydajność. Patrz [Ocena zestawów do ekstrakcji kwasów nukleinowych na stronie 101](#).
- Nie zwiększać poziomu proteinazy K lub enzymu równoważnego podczas ekstrakcji ze stężenia standardowego podanego w zestawie do ekstrakcji. Patrz [Substancje zakłócające na stronie 103](#).
- Wyekstrahowane kwasy nukleinowe należy przechowywać zgodnie z instrukcjami producenta zestawu ekstrakcyjnego.
- Przechowywać wyekstrahowane DNA przez maksymalnie 28 dni w temperaturze od -25°C do -15°C.
- Przechowywać wyekstrahowane RNA przez maksymalnie 28 dni w temperaturze od -85°C do -65°C.
- Aby uniknąć zmian stężenia w czasie, pomiar DNA i RNA należy przeprowadzić w ciągu 28 dni przed rozpoczęciem przygotowywania biblioteki. Ilościowe oznaczenie RNA i DNA należy przeprowadzić metodą fluorometryczną, w której wykorzystywane są barwniki wiążące się z kwasami nukleinowymi. Stężenie kwasu nukleinowego powinno się podawać jako średnią z co najmniej trzech pomiarów.
- Do testu wymagane jest 40 ng każdej próbki RNA przygotowanej w RNase/DNase-free water (niedołączonej do zestawu), przy czym ostateczna objętość powinna wynosić 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Do testu wymagane jest 40 ng każdej próbki gDNA przy minimalnym stężeniu ekstraktu wynoszącym 3,33 ng/µl. Cięcie (shearing) wymaga ostatecznej objętości wynoszącej 52 µl (0,77 ng/µl), przy czym jako rozpuszczalnika należy użyć buforu TEB (dostarczonego) w ilości co najmniej 40 µl.

Przechowywanie bibliotek

Biblioteki można przechowywać na niskowiążących płytkach do PCR przez 7 do 32 dni, w zależności od typu biblioteki (patrz [Tabela 5](#)).

Tabela 5 Czas przechowywania bibliotek

Typ biblioteki	Płytki	Liczba dni	Temperatura przechowywania
cDNA	PCF PCR	≤7	Od -25°C do -15°C
Fragmentowane gDNA	LP PCR	≤7	Od -25°C do -15°C
Przed wzbogacaniem	ALS PCR	≤30	Od -25°C do -15°C
Po wzbogacaniu	ELU2 PCR	≤7	Od -25°C do -15°C
PCR po wzbogacaniu	PL PCR	≤30	Od -25°C do -15°C
Normalizowane	NL PCR	≤32	Od -25°C do -15°C

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Bezpieczeństwo



OSTRZEŻENIE

Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i kontakt z oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Wentylacja powinna być odpowiednia do obsługi materiałów niebezpiecznych zawartych w odczynnikach. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i pozbywać się ich zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi. Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.

- Ze wszystkimi próbkami należy postępować jak z próbkami potencjalnie zakaźnymi.
- Należy przestrzegać środków ostrożności dotyczących rutynowych badań laboratoryjnych. Nie należy pipetować ustami. Nie należy jeść, pić ani palić tytoniu w wyznaczonych obszarach roboczych. Podczas posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy nosić jednorazowe rękawice i fartuchy laboratoryjne. Po zakończeniu posługiwania się próbkami i odczynnikami testowymi należy dokładnie umyć ręce.

Laboratorium

- Aby zapobiec zanieczyszczeniu, w laboratorium należy zorganizować jednokierunkowy przepływ pracy. Obszary przed amplifikacją i po amplifikacji muszą być wyposażone w przeznaczony sprzęt i materiały (np. pipety, końcówki do pipet, wytrząsarkę typu wortex i wirówkę). Aby zapobiec przeniesieniu produktu amplifikacji lub sondy, należy unikać powracania do obszaru przed amplifikacją po wejściu do obszaru po amplifikacji.
- Etap indeksowania PCR i wzbogacania należy wykonać w obszarze po amplifikacji, aby zapobiec przeniesieniu produktu amplifikacji.
- Procedury przygotowania biblioteki wymagają środowiska pozbawionego RNaz/DNaz.- Dokładnie zdekontaminować obszary robocze środkiem czyszczącym -hamującym działanie RNaz/DNaz. Używać wyposażenia z tworzywa certyfikowanego jako pozbawione DNaz, RNaz i ludzkiego DNA genomowego.
- W przypadku procedur po amplifikacji przed każdą procedurą i po każdej procedurze powierzchnie robocze i sprzęt należy dokładnie oczyścić świeżo przygotowanym roztworem 0,5% podchlorynu sodu (NaOCl). Pozostawić roztwór w kontakcie z powierzchniami przez 10 minut, a następnie dokładnie przemyć roztworem 70% alkoholu etylowego lub izopropylowego.
- Używać probówek mikrowirowniczych, płytek, końcówek pipet i zbiorników pozbawionych nukleaz.

- Do testu należy używać wykalibrowanego sprzętu. Sprzęt należy skalibrować w zakresie prędkości, temperatur i objętości określonych w tym protokole.
- Używać pipet automatycznych, aby zapewnić dokładne odmierzenie odczynników i próbek. Kalibrację należy przeprowadzać regularnie, zgodnie ze specyfikacją producenta.
- Podczas stosowania pipet wielokanałowych należy przestrzegać poniższych wytycznych:
 - Pipetować co najmniej $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Upewnić się, że końcówki z filtrem są dobrze dopasowane i odpowiednie dla marki i modelu pipety wielokanałowej.
 - Zamocować końcówki ruchem obrotowym tak, aby wszystkie były równie dobrze dopasowane.
 - Zaciągać płyn pod kątem 90° , utrzymując równą objętością we wszystkich końcówkach.
 - Wymieszać wszystkie składniki po podaniu, pipetując mieszaninę reakcyjną w górę i w dół.
 - Po dozowaniu sprawdzić, czy płyn jest dozowany ze wszystkich końcówek.
- Upewnić się, że używany sprzęt ma parametry zgodne ze specyfikacjami dla tego testu, a programy są ustawiane zgodnie z zaleceniami.
- Podane temperatury termocyklera i inkubatora mikropórek wskazują temperaturę reakcji, a niekoniecznie nastawę temperatury w urządzeniu.

Oznaczenie

- Należy unikać zanieczyszczenia krzyżowego.
 - Podczas postępowania z próbkami i odczynnikami należy przestrzegać zasad dobrej praktyki laboratoryjnej.
 - Pomiędzy kolejnymi próbkami, jak również dozowaniami produktów, należy wymieniać końcówki pipet oraz laboratoryjne materiały eksploatacyjne na świeże.
 - Używać końcówek z filtrem, aby zmniejszyć ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego.
 - Użyć jednokierunkowego przepływu pracy przy przechodzeniu z obszarów przed amplifikacją do obszarów po amplifikacji.
 - W danym momencie należy obsługiwać i otwierać tylko jeden starter indeksujący. Każdą próbkę ze starterem indeksującym należy ponownie zamknąć bezpośrednio po użyciu. Do zestawu dołączone są dodatkowe nakrętki.
 - Należy często zmieniać rękawiczki. Należy to robić również, jeśli mają kontakt ze starterami indeksującym lub próbkami.
 - Nieużywane próbki ze starterami indeksującym należy usunąć z obszaru roboczego.
 - Nie należy zwracać odczynników do próbek podstawowych po użyciu z próbkami na pasku, korytkiem lub zbiornikiem.
 - W odpowiednim momencie należy wymieszać próbki za pomocą pipety i poddać płytkę wirowaniu.
 - Używać wytrząsarki do mikropłytek. Nie worteksować płytek.

- Nie należy mieszać składników testów z różnych partii odczynników. Partie zestawów odczynników są wskazane na etykiecie opakowania zestawu odczynników i w arkuszu partii wyjściowej.
- Aby zapobiec zanieczyszczeniu odczynników, przyrządu, próbek i bibliotek nukleazami i produktami reakcji PCR, konieczne jest przestrzeganie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej. Zanieczyszczenie nukleazami i produktami reakcji PCR może powodować uzyskanie niedokładnych i niepewnych wyników.
- Dla zapewnienia optymalnego działania testu i przechowywania wymagany jest właściwy typ płytki. Należy przestrzegać instrukcji dotyczących przenoszenia próbek podanych w [Instrukcja użytkowania na stronie 40](#).
- Nieprzestrzeganie przedstawionych procedur może powodować błędy w wynikach lub znaczne obniżenie jakości biblioteki.
- O ile w [Instrukcja użytkowania na stronie 40](#) nie wyszczególniono punktu bezpiecznego wstrzymania procedury, należy natychmiast przejść do następnego etapu.
- Odczynniki i elementy testu należy przechowywać we wskazanej temperaturze w specjalnie wyznaczonych obszarach, z których jeden przeznaczony jest do fazy przed amplifikacją, a drugi po amplifikacji.
- Nie przechowywać odczynników w zamrażarkach bezszronowych ani w przedziałach na drzwiach lodówek.
- Nie zamrażać odczynników zawierających kulki (LNB1, SPB i SMB).
- Nie używać odczynników, które były przechowywane w nieprawidłowych warunkach.
- Dla każdego odczynnika ściśle przestrzegać procedur mieszania i postępowania. Nieodpowiednie wymieszanie lub nadmierne mieszanie na wytrząsarce typu wortex odczynników może doprowadzić do uzyskania nieprawidłowych wyników dla próbki.
- FSM, SSM, ERA1-B i TCB1 mogą zawierać cząstki stałe związane z produktem. Należy przestrzegać wytycznych dotyczących postępowania z każdym konkretnym odczynnikiem. Po wykonaniu etapów mieszania FSM i SSM pozostałe białe cząstki stałe związane z produktem nie będą miały wpływu na wydajność.
- Przygotowywać świeże mieszaniny wyjściowe, a po użyciu wyrzucać niewykorzystane pozostałości.
- Przed przeprowadzeniem procedury płukania należy zawsze przygotować świeży roztwór 80% etanolu w wodzie pozbawionej RNaz/DNaz. Etanol może pochłaniać wodę z powietrza, co może wpływać na wyniki. Po użyciu roztwór 80% etanolu należy wyrzucić zgodnie z przepisami lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi.
- Przenosić określoną objętość eluatu. Przeniesienie mniejszej niż określona objętości eluatu podczas etapów elucji może mieć wpływ na wyniki.
- Należy stosować się do poniższych wytycznych dotyczących homogenizatorów ultradźwiękowych. Należy przestrzegać instrukcji producenta.
 - Powoli załadować gDNA do próbki do homogenizatora ultradźwiękowego, aby uniknąć powstania pęcherzyków. Nadmierna ilość pęcherzyków lub szczelina powietrzna w próbce do fragmentacji może prowadzić do niepełnej fragmentacji.

- Dozowanie do próbek homogenizatora ultradźwiękowego należy wykonywać powoli, unikając rozpryskiwania.
- Aby uniknąć przemieszczenia płynu i utraty próbki, nie należy wkładać końcówki pipety do dna próbki do homogenizatora ultradźwiękowego podczas usuwania pofragmentowanego DNA.
- Nie pipetować mniej niż 2 µl wejściowego poziomu próbki.
- Nie używać korytka do dozowania odczynników w przypadku etapów, które wymagają dodania mniej niż 10 µl materiału do każdego dołka na próbkę.
- Do przenoszenia próbki pofragmentowanego gDNA z próbek do homogenizatora ultradźwiękowego na płytkę do przygotowania biblioteki (LP) należy użyć pipety z końcówkami kapilarnymi.
- Nie łączyć adapterów SUA1 i UMI.
- Adapterów SUA1 należy używać z próbkami RNA.
- Adapterów UMI należy używać z próbkami DNA.
- Należy przypisać różne startery indeksujące do każdej próbki biblioteki, aby jednoznacznie zidentyfikować każdą bibliotekę, gdy jest ona pulowana do sekwencjonowania w pojedynczej komorze przepływowej.
- Nie łączyć starterów indeksującym CPxx i UPxx w tej samej bibliotece.
- Niezgodności między próbkami i starterami indeksującymi powodują zgłaszanie nieprawidłowych wyników z powodu niemożności identyfikacji próbki dodatniej. Przed rozpoczęciem przygotowywania biblioteki należy wprowadzić identyfikatory próbek i przypisać indeksy w Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. W trakcie przygotowywania biblioteki zanotować identyfikatory próbek, startery indeksujące i orientację dołków na płytce w celach referencyjnych.
- W przypadku bibliotek pochodzących z próbek RNA należy używać tylko indeksów UPxx.
- W przypadku bibliotek pochodzących z próbek DNA należy używać indeksów UPxx lub indeksów CPxx.
- Sekwencjonować maksymalnie 8 bibliotek RNA i 8 bibliotek DNA na komorę przepływową. Sekwencjonować co najmniej trzy biblioteki. Postępować zgodnie z wytycznymi w punkcie [Liczba bibliotek i wybieranie indeksów na stronie 36](#).
- Po czynności wiązania na etapie [Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych na stronie 63](#) i [Drugie wychwytywanie sekwencji docelowych na stronie 67](#) należy przejść natychmiast do czynności płukania, aby zapobiec wyschnięciu osadu kulek.
- Podczas etapów płukania usunąć cały roztwór 80% etanolu z dna dołków. Wykazano, że pozostałości etanolu wpływają na wyniki.
- Aby uzyskać optymalne działanie testu, należy przestrzegać określonej liczby płukań, podanej w [Instrukcja użytkowania na stronie 40](#).
- Podczas procedury [Normalizacja bibliotek na stronie 74](#) należy dokładnie ponownie zawiesić osad klek będących nośnikiem biblioteki, aby uzyskać spójną gęstość w komorze przepływowej.
- Wszelkie poważne incydenty związane z tym produktem należy niezwłocznie zgłaszać do firmy Illumina i właściwych organów państw członkowskich, w których użytkownik ma siedzibę i/lub pacjent mieszka.

Uwagi dotyczące procedury

- Procedurę TSO Comprehensive (EU) można przeprowadzić według poniższego schematu:
 - Dzień 1: synteza cDNA z próbek RNA, fragmentacja DNA w próbkach gDNA, przygotowanie biblioteki i rozpoczęcie hybrydyzacji przez noc (pierwszej).
 - Dzień 2: wzbogacanie, normalizacja wzbogaconych bibliotek oraz ładowanie bibliotek do Aparat NextSeq 550Dx.

Jeśli wykonanie procedury testu TSO Comprehensive (EU) zgodnie z tym schematem nie jest możliwe, w protokole określono kilka punktów bezpiecznego wstrzymania procedury. O ile w protokole nie wyszczególniono punktu bezpiecznego wstrzymania procedury, należy natychmiast przejść do następnego etapu.

- Biblioteki pochodzące z próbek RNA i DNA mogą być przygotowywane jednocześnie w oddzielnych dołkach.
- Tabele przygotowania wyjściowej mieszaniny reakcyjnej uwzględniają nadmiar objętości, aby zapewnić wystarczającą objętość dla liczby przetwarzanych próbek.
- Należy używać wody o czystości do biologii molekularnej, która jest pozbawiona nukleaz.
- O ile nie określono inaczej, po dodaniu odczynnika należy przepłukać końcówkę, wykonując pojedyncze zasysanie i dozowanie do odpowiedniego dołka na płytce.
- Temperaturę pokojową zdefiniowano jako 15°C do 30°C.
- Odczynniki, próbki i/lub biblioteki muszą być utrzymywane w niskiej temperaturze na określonych etapach zgodnie z instrukcją użytkowania. Definiuje się to jako przechowywanie na lodzie lub jego odpowiedniku.

Programy termocyklera

- Przed rozpoczęciem protokołu należy zaprogramować programy termocyklera na sprzętach stosowanych przed amplifikacją i po niej.
- Należy się upewnić, że płytki PCR są ściśle dopasowane do termocyklera.
- Należy stosować płytki zalecane przez producenta termocyklera.

Pieczętowanie i rozpieczętowywanie płytki

- Zawsze uszczelniać płytki nową folią uszczelniającą. Nie używać folii kilkakrotnie.
- Aby uszczelnić płytkę, należy odpowiednio nałożyć na samoprzylepną folię, używając klina uszczelniającego lub wałka.
- 96-dołkową płytkę należy zawsze uszczelniać nową samoprzylepną folią uszczelniającą przed wykonaniem następujących etapów w protokole.
 - Etapy wytrząsania płytki
 - Etapy wirowania

- Etapy w termocyklerze
- Hybrydyzacje
- Przechowywanie długoterminowe
- Upewnić się, że krawędzie i dołki są uszczelnione, aby zmniejszyć ryzyko zanieczyszczenia krzyżowego i parowania.
- Umieścić płytkę na płaskiej powierzchni, a następnie powoli zdjąć folię uszczelniającą.
- Jeśli przed otwarciem na folii uszczelniającej lub bocznych ściankach dołków płytki widoczny jest jakikolwiek płyn lub kondensat, należy odwirować płytki z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
- Należy używać samoprzylepnych folii uszczelniających do płytek, które są skuteczne w temperaturze od -20°C do 100°C i nadają się do stosowania z płytkami PCR z niskim lub wysokim kołnierzem.

Wyposażenie

- Należy się upewnić, że przed rozpoczęciem testu personel laboratorium zapoznał się z instrukcjami producenta dotyczącymi obsługi i konserwacji całego sprzętu.

Typy płytek i przenoszenie płytek

- Dla zapewnienia optymalnego działania testu i przechowywania wymagany jest właściwy typ płytki.
- Podczas przenoszenia objętości pomiędzy płytkami należy przenieść określoną objętość z każdego dołka na płytce do odpowiedniego dołka na płytce docelowej.
- Do przenoszenia próbek pomiędzy paskami probówek lub płytkami można użyć pipet wielokanałowych.
- Podczas wytrząsania płytek należy stosować poniższe wytyczne.
 - Do wytrząsania płytek należy używać wytrząsarki do płytek. Nie mieszać zawartości płytek na wytrząsarce typu wortexs.
 - Płytki do PCR należy wytrząsać z prędkością 1200 obr./min.
 - Płytki MIDI należy wytrząsać z prędkością 1800 obr./min.
 - Należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta, aby upewnić się, że płytka jest dobrze zamocowana w wytrząsarce.

Wirowanie

- Kiedy instrukcje w protokole wskazują na krótkie wirowanie, należy przeprowadzić wirowanie z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
- W przypadku zaobserwowania cieczy na ściankach dołka lub na folii uszczelniającej należy odwirować płytkę z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.

Obsługa odczynników

- Wszystkie próbki z odczynnikami należy szczelnie zamknąć natychmiast po użyciu, aby ograniczyć parowanie i zapobiec zanieczyszczeniu.
- Gdy odczynniki nie będą już potrzebne podczas procedury, należy odłożyć je do miejsca przechowywania we wskazanej temperaturze.
- Należy postępować zgodnie z instrukcją przygotowania odczynnika, która znajduje się przed każdą częścią dotyczącą procedury w [Instrukcja użytkowania na stronie 40](#).
- Należy upewnić się, że przygotowano wymaganą objętość wyjściowej mieszaniny reakcyjnej, mieszaniny elucyjnej i roztworu 80% etanolu dla liczby przetwarzanych próbek.
- Objętości podane w tabelach dotyczących wyjściowej mieszaniny reakcyjnej i roztworów uwzględniają pewien nadmiar. Obliczenia nadmiaru objętości podano poniżej.
 - [Tabela 14](#)
 - $\text{Objętość FSM} = (7,2 \mu\text{l}) \times (\text{liczba próbek} + \text{kontrole}) \times (1,25).$
 - $\text{Objętość RVT} = (0,8 \mu\text{l}) \times (\text{liczba próbek} + \text{kontrole}) \times (1,25).$
 - [Tabela 21](#)
 - $\text{Objętość ERA1-B} = (7,2 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (1,20).$
 - $\text{Objętość ERA1-A} = (2,8 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (1,20).$
 - [Tabela 29](#)
 - $\text{Objętość EE2} = (20,9 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (1,364).$
 - $\text{Objętość HP3} = (1,1 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (1,364).$
 - [Tabela 30](#)
 - $\text{Objętość EE2} = (20,9 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (1,364).$
 - $\text{Objętość HP3} = (1,1 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (1,364).$
 - [Tabela 36](#)
 - $\text{Objętość LNA1} = (38,1 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (2,0).$
 - $\text{Objętość LNB1} = (6,9 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (2,0).$
 - [Tabela 37](#)
 - $\text{Objętość EE2} = (30,4 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (1,25).$
 - $\text{Objętość HP3} = (1,6 \mu\text{l}) \times (\text{liczba bibliotek}) \times (1,25).$

Zestawy adapterów

- Test TSO Comprehensive (EU) obejmuje adaptery SUA1 i UMI.
- Adaptery SUA1 służą do użytku z próbkami RNA. Nie używać z próbkami DNA.
- Adaptery UMI służą do użytku z próbkami DNA. Nie używać z próbkami RNA.

Postępowanie z kulkami

- Do testu TSO Comprehensive (EU) dołączone są trzy rodzaje kulek (SPB, SMB i LNB1). Należy upewnić się, że podczas procedury używany jest prawidłowy rodzaj kulek.
- Przeprowadzić odpowiednią liczbę płukań dla każdego rodzaju kulek.
- Upewnić się, że przed użyciem kulki osiągnęły temperaturę pokojową.
- Przed użyciem kulki mieszać przez 1 minutę, aby zapewnić ich jednorodność.
- Podczas mieszania kulek za pomocą pipety należy przestrzegać poniższych wskazówek:
 - Użyć odpowiedniej pipety i końcówki w rozmiarze dostosowanym do mieszanej objętości.
 - Dostosować ustawienie objętości na mniej więcej 50–75% objętości próbki.
 - Pipetować powoli, nie zwalniając tłoka.
 - Unikać rozpryskiwania i wprowadzania pęcherzyków.
 - Umieścić końcówkę pipety nad osadem i dozować bezpośrednio na osad, aby unieść kulki z dna dołka lub probówki.
 - Upewnić się, że osad kulek został w pełni zawieszony. Roztwór powinien mieć ciemnobrązowy kolor i jednorodną konsystencję.
 - Sprawdzić, czy obecny jest osad kulek. Ostrożnie zassać cały roztwór kulek z dołka w końcówce i obejrzeć dno dołków.
- Jeśli kulki zostaną zassane do końcówek pipet podczas etapów separacji magnetycznej, należy dozować kulki z powrotem do dołka płytki umieszczonej na statywie magnetycznym. Przed przejściem do następnego etapu procedury należy odczekać, aż płyn stanie się przejrzysty (około 2 minut).
- Podczas płukania kulek:
 - Użyć zalecanego statywu magnetycznego dla płytek.
 - Dozować płyn bezpośrednio na osad kulek, aby zwilżyć kulki znajdujące się na ściankach dołków.
 - Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym, aż procedura będzie wymagała jej zdjęcia.
 - Nie poruszać płytką umieszczoną na statywie magnetycznym.
 - Kiedy płytka znajduje się na statywie magnetycznym, nie wolno wzruszać osadu kulek.
- Podczas płukania kulek lub usuwania nadsącza należy ustawiać końcówki pipet pod kątem na dnie dołków, aby uniknąć wytworzenia podciśnienia i zaciągania roztworu do filtrów końcówek pipet.

Liczba bibliotek i wybieranie indeksów

Przed konfiguracją przebiegu należy zaplanować liczbę bibliotek próbek oraz indeksów próbek do sekwencjonowania. Poniższe wytyczne dotyczące liczby próbek obejmują kontrole dodatnie, ale nie obejmują kontroli ujemnych/bez matrycy (NTC). Do planowanego przebiegu należy dodać NTC jako dodatkową próbkę.

Dla TSO Comprehensive (EU) należy postępować zgodnie z wytycznymi zawartymi w [Tabela 6](#) i [Tabela 7](#) w celu określenia liczby bibliotek RNA i/lub DNA do sekwencjonowania w jednej komorze przepływowej. W przypadku sekwencjonowania bibliotek RNA *albo* DNA oddzielnie patrz [Tabela 6](#). W przypadku sekwencjonowania bibliotek RNA i DNA w jednej komorze przepływowej patrz [Tabela 7](#).

Tabela 6 Sekwencjonowanie bibliotek RNA *albo* DNA

Typ biblioteki	Minimum*	Maksimum*
Tylko RNA	3	16
Tylko DNA	3	8

* NTC nie przyczyniają się do krotności.

Tabela 7 Sekwencjonowanie bibliotek RNA i DNA w jednej komorze przepływowej

Typ biblioteki	Minimum*	Maksimum*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC nie przyczyniają się do krotności.

W celu optymalnego wykorzystania odczynników podczas sekwencjonowania bibliotek DNA i RNA za pomocą TSO Comprehensive (EU) w Aparat NextSeq 550Dx przeprowadzić sekwencjonowanie 8 bibliotek RNA i 8 bibliotek DNA na komorę przepływową.

Startery indeksujące jednoznacznie identyfikują każdą próbkę, dzięki czemu biblioteki mogą być pulowane w celu umożliwienia sekwencjonowania w jednej komorze przepływowej. Zgodne kombinacje indeksów są wyświetlane na ekranie Create Run (Utwórz przebieg) podczas konfigurowania przebiegu w Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. Podczas przygotowywania biblioteki należy dodać starter indeksujący do każdej biblioteki próbek. ***Dla każdej biblioteki próbek należy użyć innej mieszanki starterów indeksujących.***

Należy upewnić się, że startery indeksujące używane z próbkami są zgodne z indeksami wybranymi do analizy w Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. ***Niezgodności powodują nieprawidłowe zgłaszanie wyników z powodu utraty identyfikacji próbki dodatkowo.***

W teście TSO Comprehensive (EU) istnieją dwa rodzaje indeksów.

- **Indeksy UPxx** – przeznaczone dla bibliotek uzyskanych z próbek RNA lub DNA.
- **Indeksy CPxx** – przeznaczone dla bibliotek uzyskanych z próbek DNA. Nie używać indeksów CPxx dla bibliotek uzyskanych z RNA lub w przypadku sekwencjonowania łącznie tylko trzech bibliotek DNA.

W przypadku sekwencjonowania tylko trzech bibliotek należy spełnić następujące wymagania:

- Biblioteki muszą obejmować wyłącznie DNA lub wyłącznie RNA.
- Nie należy używać zestawów indeksów CPxx.
- Aby zapewnić odpowiednie zróżnicowanie, wymagany jest jeden z następujących zestawów indeksów UPxx:
 - UP01, UP02 i UP03
 - UP04, UP05 i UP06
 - UP07, UP08 i UP09
 - UP10, UP11 i UP12

Na przykład: do pierwszej biblioteki przypisany jest indeks UP01, do drugiej – UP02, a do trzeciej – UP03.

TruSight Oncology Kontrole

TSO Comprehensive (EU) wymaga odczynnika Kontrole TruSight Oncology Controls, który składa się z kontroli DNA Control TruSight Oncology i kontroli RNA Control TruSight Oncology jako kontroli dodatknych. Zawiera on kontrolę TruSight Oncology DNA Control dla każdego przebiegu sekwencjonowania DNA oraz kontrolę TruSight Oncology RNA Control dla każdego przebiegu sekwencjonowania RNA w ramach przygotowania danej biblioteki (zawierają one również kontrole dla równoległych przebiegów sekwencjonowania DNA i RNA). Dla każdego zaplanowanego przebiegu sekwencjonowania przygotowana jest unikalna kontrola dodatnia. Więcej informacji można znaleźć w sekcji TruSight Oncology Controls Package Insert (Ulotka dołączona do opakowania kontroli TruSight Oncology Control) (nr dokumentu: 200009919).

Dodatnia ilość wejściowa kontroli wynosi 40 ng dla DNA i RNA.

Zawiera on właściwą kontrolę NTC dla każdej przygotowywanej biblioteki RNA i DNA. NTC jest sekwencjonowana wielokrotnie w ramach każdej przygotowywanej biblioteki. Należy postępować zgodnie z poniższymi wytycznymi dotyczącymi Kontrole TruSight Oncology Controls:

- Przygotować biblioteki z kontroli dodatknych i kontroli bez matrycy identycznie jak dla próbek.
- W przypadku kontroli NTC DNA użyć odczynnika TEB.
- W przypadku kontroli NTC RNA użyć wody pozbawionej DNaz/RNaz.
- Kontrole dodatnie zostały uwzględnione w maksymalnym wymiarze biblioteki.
- Kontrole NTC nie zostały uwzględnione w minimalnym wymiarze biblioteki.
- Dla kontroli NTC należy użyć indeksów UP podczas sekwencjonowania tylko 3 bibliotek.
- Ponieważ kontrola NTC jest sekwencjonowana wielokrotnie, indeksy wybrane dla tej kontroli nie mogą się powtarzać podczas przygotowania biblioteki.

Poniższe tabele przedstawiają przykładowe układy płytek służące do przygotowania biblioteki. Każda numerowana kolumna reprezentuje pojedynczy przebieg sekwencjonowania. Podczas jednoczesnego

sekwencjonowania bibliotek DNA i RNA, każdy odpowiadający zestaw kolumn reprezentuje pojedynczy przebieg sekwencjonowania (np. kolumna 1 i kolumna 7). Kontrola NTC jest sekwencjonowana dla każdej kolumny lub zestawu kolumn.

Tabela 8 Przygotowanie biblioteki dla pojedynczego przebiegu sekwencjonowania obejmującego sześć próbek pacjentów

	1	2	3	4	5	6	7
A	Dodatnia kontrola DNA	puste	puste	puste	puste	puste	Dodatnia kontrola RNA
B	DNA 1	puste	puste	puste	puste	puste	RNA 1
C	DNA 2	puste	puste	puste	puste	puste	RNA 2
D	DNA 3	puste	puste	puste	puste	puste	RNA 3
E	DNA 4	puste	puste	puste	puste	puste	RNA 4
F	DNA 5	puste	puste	puste	puste	puste	RNA 5
G	DNA 6	puste	puste	puste	puste	puste	RNA 6
H	DNA NTC	puste	puste	puste	puste	puste	Kontrola NTC RNA

Tabela 9 Przygotowanie biblioteki dla trzech przebiegów sekwencjonowania obejmujących 20 próbek pacjentów

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

Instrukcja użytkowania

Opis procedury TSO Comprehensive (EU) przedstawiono na [Rysunek 1](#) i [Rysunek 2](#).

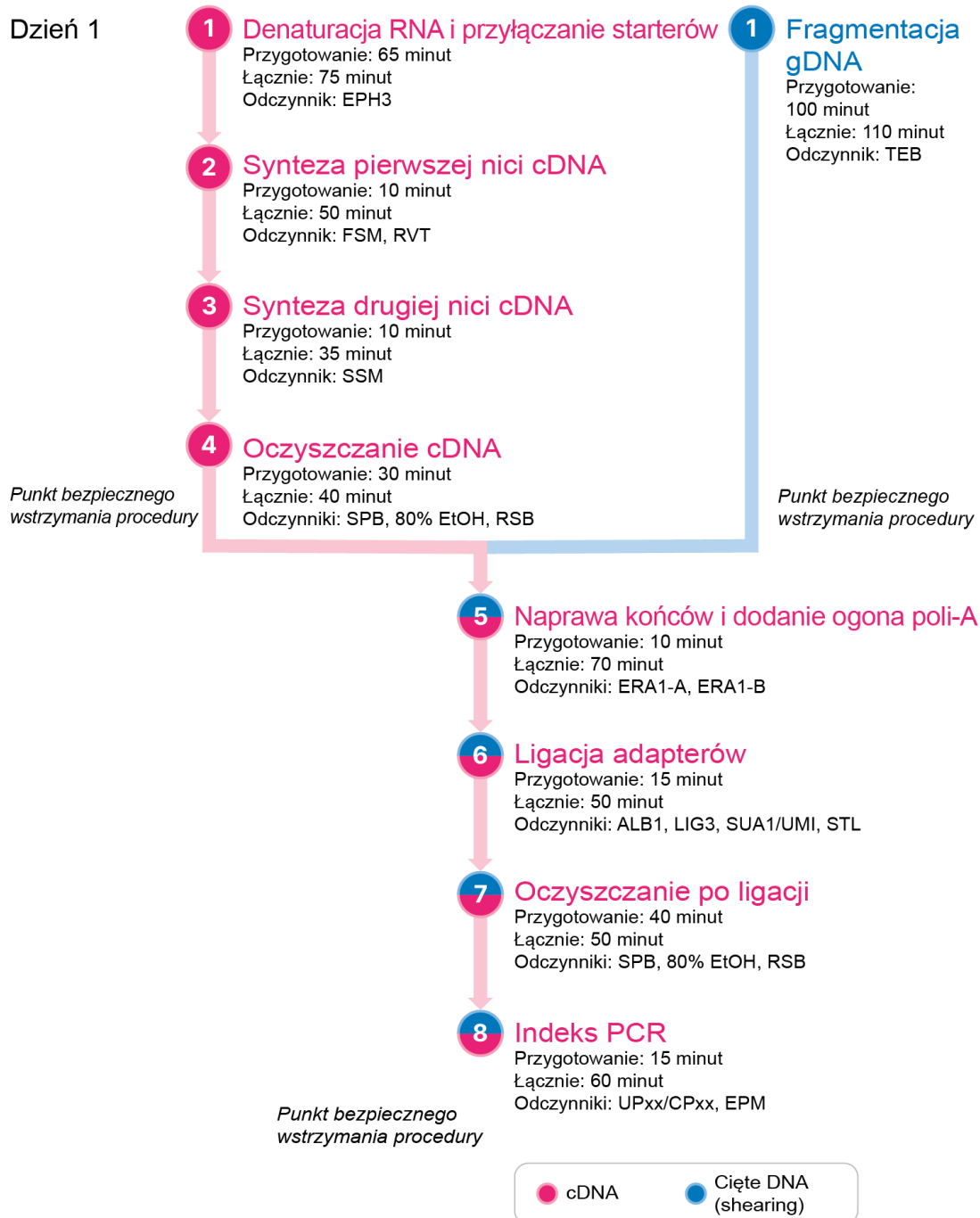
Procedura przygotowania biblioteki

[Rysunek 1](#) przedstawia procedurę przygotowania biblioteki dla testu TSO Comprehensive (EU). Biblioteki w oparciu o próbki RNA i DNA można przygotowywać jednocześnie w osobnych dołkach. Kontrole dodatnie i kontrole bez matrycy należy przetwarzać identycznie jak próbki. Punkty bezpiecznego wstrzymania procedury są wskazane pomiędzy etapami.

Przed rozpoczęciem protokołu wprowadzić informacje o przebiegu i próbce do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module. Patrz *Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module* (nr dokumentu: 200008661).

Rysunek 1 Procedura TSO Comprehensive (EU) (część 1)

Dzień 1

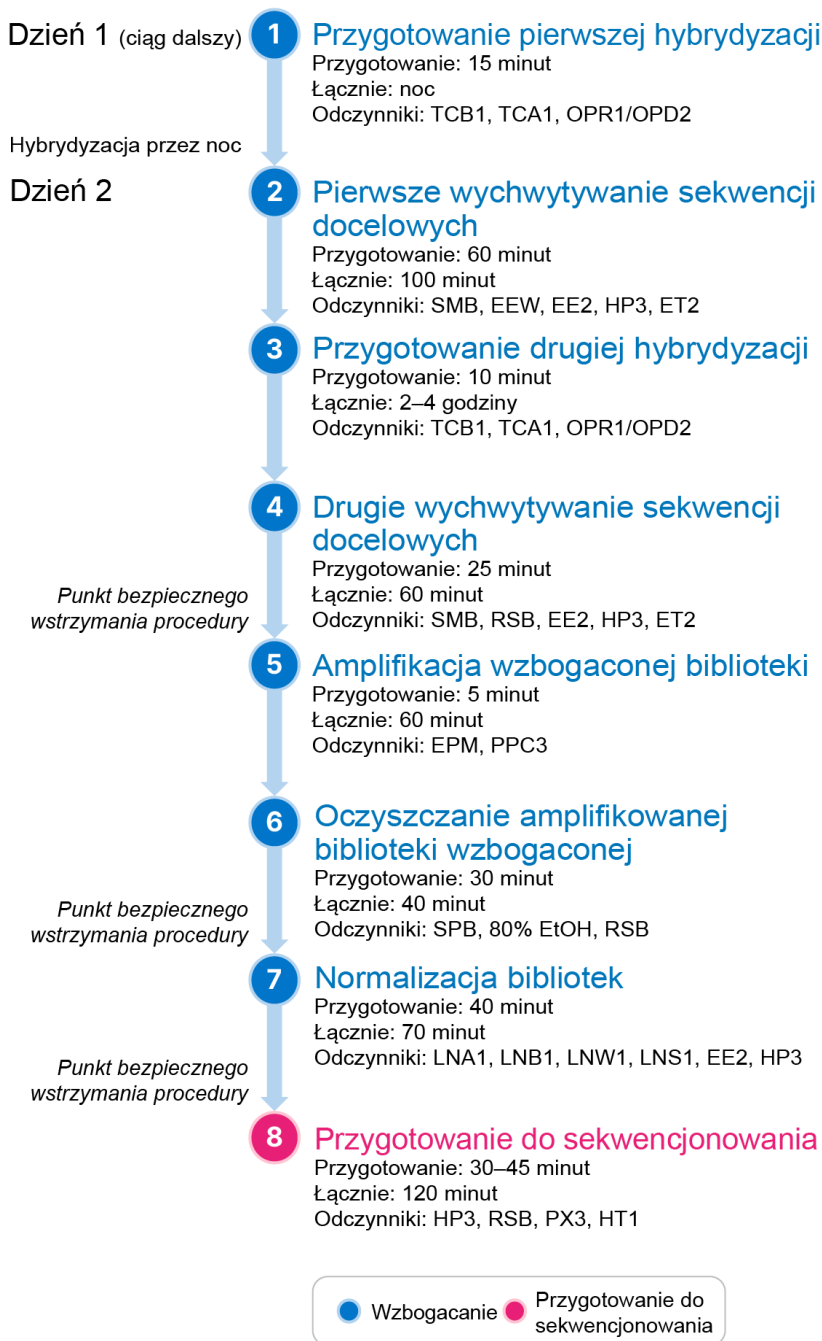


* Czas przygotowania i czas łącznie podano w przybliżeniu.

Procedura wzbogacania

Rysunek 2 przedstawia procedurę wzbogacania w ramach TSO Comprehensive (EU). Punkty bezpiecznego wstrzymania procedury są zaznaczone pomiędzy poszczególnymi etapami.

Rysunek 2 Procedura TSO Comprehensive (EU) (część 2)



Programowanie termocyklerów

Przed rozpoczęciem testu należy zapisać następujące programy w termocyklerach używanych na etapie przed amplifikacją i po amplifikacji.

Tabela 10 Programy termocyklera przed amplifikacją

Etap procedury	Nazwa programu	Temperatura pokrywy	Objętość reakcji	Parametry termocyklera
Denaturacja RNA i przyłączanie starterów	LQ-RNA	100°C	17 µl	65°C przez 5 minut 4°C przez 1 minutę - Pozostawić w temperaturze 4°C
Synteza pierwszej nici cDNA	1stSS	100°C	25 µl	25°C przez 10 minut 42°C przez 15 minut 70°C przez 15 minut 4°C przez 1 minutę - Pozostawić w temperaturze 4°C
Synteza drugiej nici cDNA	2ndSS	30°C	50 µl	16°C przez 25 minut 4°C przez 1 minutę - Pozostawić w temperaturze 4°C

UWAGA Jeśli temperatura pokrywy dla programu 2ndSS nie może zostać ustawiona na 30°C, należy wyłączyć opcję podgrzewania pokrywy.

Tabela 11 Programy termocyklera po amplifikacji

Etap procedury	Nazwa programu	Temperatura pokrywy	Objętość reakcji	Parametry termocyklera
Indeksowanie PCR	I-PCR	100°C	50 µl	98°C przez 30 sekund 15 cykli po: 98°C przez 10 sekund 60°C przez 30 sekund 72°C przez 30 sekund 72°C przez 5 minut - Pozostawić w temperaturze 10°C
Wykonanie pierwszej hybrydyzacji	HYB1	100°C	50 µl	95°C przez 10 minut 85°C przez 2 min 30 sekund 75°C przez 2 min 30 sekund 65°C przez 2 min 30 sekund - Pozostawić w temperaturze 57°C przez 8 do 24 godzin

Etap procedury	Nazwa programu	Temperatura pokrywy	Objętość reakcji	Parametry termocyklera
Wykonanie drugiej hybrydyzacji	HYB2	100°C	50 µl	• 95°C przez 10 minut • 85°C przez 2 min 30 sekund • 75°C przez 2 min 30 sekund • 65°C przez 2 min 30 sekund • Pozostawić w temperaturze 57°C przez 1,5 do 4 godzin
Amplifikacja biblioteki wzbożonej	EL-PCR	100°C	50 µl	• 98°C przez 30 s • 18 cykli po: • 98°C przez 10 s • 60°C przez 30 s • 72°C przez 30 s • 72°C przez 5 min • Pozostawić w temperaturze 10°C

Przygotowanie do realizacji protokołu

Przygotowanie to jest wymagane do wykonania kroków protokołu prowadzących do następnego bezpiecznego punktu zatrzymania.



PRZESTROGA

Wszystkie procedury w przebiegu pracy wymagają środowiska pozbawionego RNaz/DNaz.

1. Dokładnie zdekontaminować obszary robocze środkiem czyszczącym hamującym działanie RNaz/DNaz.
2. Upewnić się, że ustawione są programy termocyklera przed amplifikacją. Patrz [Programowanie termocyklerów na stronie 43](#).
3. Aby skonfigurować homogenizator ultradźwiękowy, należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta.
4. W przypadku przetwarzania tylko próbek DNA przejść od razu do punktu [Fragmentacja gDNA na stronie 50](#).
5. Wyjąć kontrole RNA z miejsca przechowywania.
6. Wyjąć próbki z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (nr kat. 20031127)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
EPH3	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Denaturacja RNA i przyłączanie starterów
FSM	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Synteza pierwszej nici cDNA

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
RVT	Od -25°C do -15°C	Utrzymywać niską temperaturę.	Synteza pierwszej nici cDNA
SSM	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Synteza drugiej nici cDNA

Tabela 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (nr kat. 20031119)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
SPB (jasnozielona etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.	Oczyszczanie cDNA
RSB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Oczyszczanie cDNA

Denaturacja RNA i przyłączanie starterów

W ramach tego procesu, mającego na celu przygotowanie do syntezy cDNA, następuje denaturacja oczyszczonego RNA i przyłączanie losowych starterów heksamerowych.

Przygotowanie

- Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - EPH3 – odstawić.
 - FSM – wymieszać na wytrząsarce typu worteks. Krótco odwirować, a następnie wymieszać, pipetując. Odczynnik może zawierać białe cząstki stałe związane z produktem. Nie jest wymagane żadne działanie użytkownika. Nie ma to wpływu na wydajność produktu.
 - RVT – krótco odwirować, a następnie wymieszać, pipetując. Utrzymywać niską temperaturę.

UWAGA RVT jest roztworem lepkiem. Podczas pipetowania należy minimalizować tworzenie się pęcherzyków powietrza.

- W probówce mikrowiornicznej połączyć następujące objętości, aby przygotować mieszaninę wyjściową FSM + RVT.

Tabela 14 Wyjściowa mieszanina reakcyjna FSM + RVT*

Składnik wyjściowej mieszaniny reakcyjnej	4 biblioteki (μl)	8 bibliotek (μl)	16 bibliotek (μl)	24 biblioteki (μl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* W tej tabeli uwzględniono nadmiar objętości. Więcej informacji o obliczeniach zawiera sekcja [Obsługa odczynników na stronie 35](#).

- Wymieszać, pipetując 10 razy.
- Mieszaninę wyjściową FSM + RVT utrzymywać w niskiej temperaturze do czasu rozpoczęcia etapu [Synteza pierwszej nici cDNA na stronie 47](#).

Procedura

- Podczas rozmrażania próbki wyekstrahowanego RNA i kontrole RNA utrzymywać w niskiej temperaturze. Przetwarzać kontrole RNA tak jak próbki w pozostałej części protokołu.
- Gdy RNA nie jest używane, przechowywać w niskiej temperaturze. Informacje o ilościowym oznaczaniu próbek zawiera część [Wymagania dotyczące próbek na stronie 27](#).
- Każdą próbkę RNA wymieszać, pipetując 10 razy.
- Użyć wody pozbawionej RNaz/DNaz do przygotowania 40 ng każdej próbki RNA w końcowej objętości 8,5 μl (4,7 ng/μl).
W przypadku kontroli RNA należy użyć stężenia podanego na etykiecie próbki.
- Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę do PCR jako CF (Fragmenty cDNA).
- Dodać 8,5 μl każdej próbki RNA do unikalnego dołka na płytce do PCR oznaczonej CF.
- Upewnić się, że układ płytki z próbkami oraz indeksy dla każdej próbki są zgodne z przebiegiem zaplanowanym w Moduł analityczny TSO Comprehensive (EU) podczas konfiguracji przebiegu.
- Odczynnik EPH3 wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.
- Dodać 8,5 μl odczynnika EPH3 do każdego dołka na próbkę.
- Na płytkę do PCR oznaczoną CF nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.



PRZESTROGA

Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.

- Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.
- Odwirować z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę.
- Umieścić w termocyklerze i uruchomić program LQ-RNA.
Patrz [Programowanie termocyklorów na stronie 43](#).
- Gdy próbki osiągną temperaturę 4°C, pozostawić na 1 minutę. Przejść natychmiast do następnego kroku.

Synteza pierwszej nici cDNA

Ten proces polega na odwrotnej transkrypcji fragmentów RNA, do których dołączają się losowe heksamery na pierwszą nici cDNA w reakcji katalizowanej przez odwrotną transkryptazę (reverse transcriptase).

Procedura

1. Wyjąć płytkę do PCR oznaczoną CF z termocyklera.
2. Wymieszać mieszaninę wyjściową FSM + RVT, pipetując 10 razy. Upewnić się, że mieszanina FSM + RVT jest całkowicie jednorodna.
3. Dodać 8 µl wyjściowej mieszaniny reakcyjnej FSM + RVT do każdego dołka na próbkę.
4. Wymieszać, pipetując 10 razy.
5. Wyrzucić pozostałą wyjściową mieszaninę reakcyjną FSM + RVT.
6. Na płytkę do PCR oznaczoną CF nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
7. Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.
8. Odwirować z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
9. Umieścić w termocyklerze i uruchomić program 1stSS.
Patrz [Programowanie termocyklerów na stronie 43](#).
10. Kiedy próbki osiągną temperaturę 4°C, należy natychmiast przejść do kolejnego etapu.
Próbki pierwszej nici można przechowywać w temperaturze 4°C przez maksymalnie 5 minut.

Synteza drugiej nici cDNA

W tym procesie usuwana jest matryca RNA i syntetyzowany dwuniciowy cDNA.

Przygotowanie

1. Przygotowanie SSM:
 - a. Odwrócić 10-krotnie w celu zmieszania.
 - b. Krótko odwirować. Odczynnik może zawierać białe cząstki stałe związane z produktem. Nie jest wymagane żadne działanie użytkownika. Nie ma to wpływu na wydajność produktu.

Procedura

1. Wyjąć płytkę do PCR oznaczoną CF z termocyklera.
2. Dodać 25 µl SSM do każdego dołka na próbkę.
3. Na płytkę do PCR oznaczoną CF nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
4. Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.

5. Odwirować z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę.
6. Umieścić w termocyklerze i uruchomić program 2ndSS.
Patrz [Programowanie termocyklerów na stronie 43](#).
7. Kiedy próbki osiągną temperaturę 4°C, należy poczekać 1 minutę i natychmiast przejść do kolejnego etapu.

Oczyszczanie cDNA

W tym procesie odczynnik SPB jest wykorzystywany do oczyszczenia cDNA z niepożądanych składników reakcji. Kulki są dwukrotnie przemywane świeżo sporządzonym 80% EtOH. cDNA jest poddawane elucji z użyciem RSB.

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - SPB – upewnić się, że kulki pozostawały w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - RSB – odstawić do wykorzystania podczas procedury.
2. Przygotować świeży 80% roztwór EtOH w probówce stożkowej o poj. 15 ml lub 50 ml w następujący sposób.

Tabela 15 Przygotować świeży roztwór 80% EtOH

Odczynnik	4 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki
100% EtOH, czysty	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Woda pozbawiona RNaz/DNaz	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Świeżo sporządzony 80% roztwór EtOH wymieszać na wytrząsarce typu worteks.
4. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako BIND1 (wiązaną cDNA).
5. Przykryć i odłożyć.
6. Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

1. Wyjąć płytkę do PCR oznaczoną CF z termocyklera.
2. Odczynnik SPB wymieszać na wytrząsarce typu worteks przez 1 minutę, aby rozprzecznić kulki w zawiesinie.
3. Niezwłocznie dodać 90 µl odczynnika SPB do każdego dołka na próbkę na płytce BIND1 MIDI.
W przypadku korzystania z korytka do dozowania należy uwzględnić nadmiar odczynnika SPB wynoszący 1,15, aby podczas pipetowania dysponować wystarczającą ilością materiału na próbkę. Po dodaniu odczynnika SPB do każdego dołka na próbkę wyrzucić wszelkie resztki materiału.

4. Przenieść całą objętość (50 µl) każdej próbki z płytki do PCR oznaczonej jako CF do odpowiedniego dołka na płytce MIDI oznaczonej BIND1.
5. Wyrzucić pustą płytkę do PCR oznaczoną CF.
6. Na płytkę MIDI oznaczoną BIND1 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
7. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
8. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
9. Umieścić płytkę MIDI oznaczoną BIND1 na statywie magnetycznym na 5 minut.
10. Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i wyrzucić cały nadsącz z każdego dołka.

Przemywanie

1. Przemywać kulki zgodnie z poniższym opisem.
 - a. Pozostawić płytkę MIDI oznaczoną BIND1 na statywie magnetycznym i dodać 200 µl świeżego 80% roztworu EtOH do każdego dołka.
 - b. Odczekać 30 sekund.
 - c. Bez naruszania osadu kulek za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka na próbkę.
2. Przemyć kulki po raz **drugi**.
3. Użyć pipety z końcówkami kapilarnymi, aby usunąć pozostałości EtOH z każdego dołka.
4. Wyrzucić niewykorzystany 80% roztwór EtOH.

Elucja

1. Zdjąć płytkę MIDI oznaczoną BIND1 ze statywu magnetycznego.
2. Wymieszać odczynnik RSB przez odwracanie lub użycie wytrząsarki typu worteks.
3. Dodać 22 µl odczynnika RSB do każdego dołka na próbkę.
4. Na płytkę MIDI oznaczoną BIND1 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
5. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
6. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
7. Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
8. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako PCF (Oczyszczone fragmenty cDNA).
Jeśli użytkownik przerywa w [PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY na stronie 50](#), należy użyć płytki do PCR.
9. Przenieść 20 µl eluatu z każdego dołka na próbkę na płytce BIND1 MIDI do odpowiedniego dołka na płytce PCF.
10. Wyrzucić pustą płytkę MIDI oznaczoną BIND1.

11. Dodać 30 µl odczynnika RSB do każdego dołka na próbkę na płytce PCF.
12. Wymieszać, pipetując 10 razy.
13. Nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą na płytkę PCF i utrzymywać płytkę w niskiej temperaturze.
14. Odłożyć odczynniki EPH3, FSM, RVT i SSM do miejsca przechowywania.
15. Jeśli użytkownik przetwarza próbki uzyskane wyłącznie z RNA (cDNA) i nie przerywa w punkcie bezpiecznego wstrzymania procedury, należy przejść do etapu [Naprawa końców i dodanie ogona poli-A na stronie 54](#).

PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY

W przypadku wstrzymania procedury należy odwirować płytkę do PCR oznaczoną PCF z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 7 dni.

Przygotowanie do realizacji protokołu

Przygotowanie to jest wymagane do wykonania kroków protokołu prowadzących do następnego bezpiecznego punktu zatrzymania.

1. Wyjąć kontrolę DNA z miejsca przechowywania.
2. Wyjąć próbkę z odczynnikiem z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (nr kat. 20031119)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
TEB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Fragmentacja gDNA

Fragmentacja gDNA

Podczas tego procesu następuje fragmentacja gDNA i powstają odcinki dsDNA z lepкими końcami 3' lub 5'.

Przygotowanie

1. Należy przestrzegać zaleceń dotyczących [Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28](#) w celu ilościowej analizy próbek.
2. Przygotowanie TEB – wymieszać przez odwracanie lub użycie wytrząsarki typu worteks.

Procedura

Przygotowanie płytki

Wybrać jedną z poniższych opcji przygotowania płytki:

- Przetworzyć próbki gDNA jednocześnie z próbkami cDNA na płytce MIDI oznaczonej PCF.

- a. Oznaczyć płytkę MIDI oznaczoną PCF jako LP (Przygotowanie Biblioteki).
 - b. Utrzymywać w niskiej temperaturze i odłożyć do wykorzystania, jak opisano w punkcie [Przenoszenie fragmentowanego DNA na stronie 52](#).
- Przetworzyć próbki gDNA jednocześnie z próbkami cDNA, płytka do PCR oznaczona jako PCF jest zamrożona.
 - a. Rozmrozić płytkę do PCR oznaczoną jako PCF w temperaturze pokojowej.
 - b. Odwirować z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
 - c. Wymieszać, pipetując 10 razy.
 - d. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako LP (Przygotowanie biblioteki).
 - e. Przenieść całą objętość (50 μ l) każdej próbki z płytki do PCR oznaczonej jako PCF do odpowiedniego dołka na płytce MIDI oznaczonej LP.
 - f. Wyrzucić płytkę do PCR oznaczoną jako PCF.
 - g. Nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą i utrzymywać w niskiej temperaturze do momentu wykonania czynności opisanych w części [Przenoszenie fragmentowanego DNA na stronie 52](#).
 - Przetworzyć wyłącznie próbki gDNA.
 - a. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako LP (Przygotowanie biblioteki).
Jeśli użytkownik przerywa w [PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY na stronie 52](#), należy użyć płytki do PCR.
 - b. Przykryć i odłożyć do wykorzystania, jak opisano w punkcie [Przenoszenie fragmentowanego DNA na stronie 52](#).

Rozcieńczanie gDNA

1. Rozmrozić próbki gDNA i kontrole DNA w temperaturze pokojowej.
2. Każdą próbkę gDNA wymieszać, pipetując 10 razy.
3. Krótco odwirować probówkę, aby osadzić kropelki.
4. Wymieszać odczynnik TEB przez odwracanie lub użycie wytrząsarki typu worteks.
5. Użyć odczynnika TEB do przygotowania każdej próbki gDNA w końcowej objętości 52 μ l. W poniższej tabeli podano ilości wejściowe i minimalne stężenia w zależności od typu próbki.
 - W oznaczeniu wymagane jest minimalne stężenie ekstraktu, aby z objętości 52 μ l co najmniej 40 μ l stanowił odczynnik TEB.
 - W przypadku kontroli DNA należy użyć stężenia podanego na etykiecie probówki.
 - Aby zapobiec utracie próbki, do tego rozcieńczenia nie należy pipetować mniej niż 2 μ l próbki.

Typ próbki	Ilość wejściowa (ng)	Minimalne stężenie (ng/ μ l)
FFPE	40	3,33
Kontrola	40	Patrz etykieta probówki

Fragmentacja

1. Dodać 52 µl każdej próbki gDNA do oddzielnego dołka w probówce ultrasonikatora.



PRZESTROGA

Powoli nanieść gDNA do probówki, upewniając się, że przy dnie probówki nie ma przestrzeni powietrznych. Więcej informacji zawiera część [Oznaczenie na stronie 30](#) oraz instrukcja producenta.

2. Zanotować orientację paska.
3. Przeprowadzić fragmentację gDNA za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego.

Przenoszenie fragmentowanego DNA

1. Należy upewnić się, że układ płytki próbek i indeksy dla każdej próbki są zgodne z serią sekwencjonowania wybraną do analizy z Moduł analityczny TSO Comprehensive (EU).
2. Aby odzyskać próbkę, należy postępować zgodnie z instrukcjami producenta homogenizatora ultradźwiękowego.
W przypadku niektórych typów komórek do homogenizatora ultradźwiękowego wymagane jest odwirowanie w celu osadzenia próbki w probówce.
3. W przypadku każdej próbki fragmentowanego gDNA należy użyć pipety z końcówkami kapilarnymi, aby trzykrotnie przenieść po 16,7 µl do pustego dołka na płytce MIDI oznaczonej LP.
4. Na płytkę MIDI oznaczoną LP nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.

PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY

W przypadku wstrzymania procedury nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą na płytkę do PCR oznaczoną LP, a następnie odwirować z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę. Przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 7 dni.

Przygotowanie do realizacji protokołu

Przygotowanie to jest wymagane do wykonania kroków protokołu prowadzących do następnego bezpiecznego punktu zatrzymania.

Upewnić się, że ustawione są programy termocyklera po amplifikacji. Patrz [Programowanie termocyklerów na stronie 43](#).

1. Przygotować pojemnik na lód lub jego odpowiednik.
2. Wyjąć probówki z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (nr kat. 20031118)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
ERA1-A	Od -25°C do -15°C	Utrzymywać niską temperaturę.	Naprawa końców i dodanie ogona poli-A
ERA1-B	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Naprawa końców i dodanie ogona poli-A
ALB1	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Ligacja adapterów
LIG3	Od -25°C do -15°C	Utrzymywać niską temperaturę.	Ligacja adapterów
SUA1 (niebieska nakrętka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Ligacja adapterów
UMI (biała nakrętka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Ligacja adapterów
STL	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Ligacja adapterów
EPM	Od -25°C do -15°C	Utrzymywać niską temperaturę.	Indeksowanie PCR

Tabela 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (nr kat. 20031119)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
SPB (jasnozielona etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.	Oczyszczanie po ligacji
RSB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Oczyszczanie po ligacji

Tabela 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (nr kat. 20031120)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
UPxx	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić odpowiednie próbki ze starterami indeksującym do temperatury pokojowej.	Indeksowanie PCR

Tabela 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (nr kat. 20031126)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
CPxx	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić odpowiednie probówki ze starterami indeksującym do temperatury pokojowej.	Indeksowanie PCR

Naprawa końców i dodanie ogona poli-A

W tym procesie, przy użyciu wyjściowej mieszaniny reakcyjnej End Repair A-Tailing (ERA1) naprawiane są lepkie końce powstałe w wyniku fragmentacji i przyłączane są ogony A.

Aktywność egzonukleazy 3'→5' w tej mieszaninie usuwa lepkie końce 3', a aktywność polimerazy 5'→3' dopełnia lepkie końce 5'. Na końcach 3' w wyniku tej reakcji powstaje ogon poli-A, co zapobiega wzajemnej ligacji fragmentów podczas reakcji ligacji adapterów.

Przygotowanie

- Podgrzać 2 inkubatory mikropiórek z wkładkami grzejnymi do płytek MIDI w następujący sposób.
 - Podgrzać inkubator mikropiórek do 30°C.
 - Podgrzać inkubator mikropiórek do 72°C.
- Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ERA1-A – krótko odwirować, a następnie wymieszać, pipetując. Utrzymywać niską temperaturę.
 - ERA1-B – wymieszać na wytrząsarce typu wortexs, a następnie krótko odwirować. Sprawdzić pod kątem precypitacji. Jeśli występuje, ogrzać probówkę do 37°C, a następnie mieszać, pipetując do momentu rozpuszczenia precypitatów.
- Przygotować wyjściową mieszaninę reakcyjną ERA1 w probówce mikrowiorniczej.

Tabela 21 Wyjściowa mieszanina reakcyjna ERA1*

Składnik wyjściowej mieszaniny reakcyjnej	4 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
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

* W tej tabeli uwzględniono nadmiar objętości. Więcej informacji o obliczeniach zawiera sekcja [Obsługa odczynników na stronie 35](#).

- Powoli przepipetować 10 razy w celu zapewnienia jednorodności, a następnie krótko odwirować. Utrzymywać niską temperaturę mieszaniny reakcyjnej ERA1.
- Aby przygotować płytkę, wybrać jedną z poniższych opcji:

- Jeśli próbki znajdują się na płytce MIDI, należy przygotować ją w następujący sposób.
 - a. Ponownie oznaczyć płytkę MIDI napisem LP2 (Przygotowanie biblioteki 2).
 - b. Jeśli niektóre próbki znajdują się na oddzielnych płytkach MIDI, należy przenieść wszystkie próbki do oddzielnych dołków na tej samej płytce MIDI zgodnie z układem płytki.
- Jeśli płytka jest zamrożona, należy przygotować ją w następujący sposób.
 - a. Rozmrozić płytkę do PCR oznaczoną PCF lub płytkę oznaczoną LP w temperaturze pokojowej.
 - b. Odwirować płytkę z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
 - c. Wymieszać, pipetując 10 razy.
 - d. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako LP2 (Przygotowanie biblioteki 2).
 - e. Przenieść pełną objętość (50 μ l) każdej próbki z płytki do PCR oznaczonej PCF lub płytki oznaczonej LP do odpowiedniego dołka na płytce MIDI oznaczonej LP2.
 - f. Wyrzucić płytkę do PCR oznaczoną PCF lub płytkę oznaczoną LP.

Procedura

1. Dodać 10 μ l wyjściowej mieszaniny reakcyjnej ERA1 do każdego dołka na próbce na płytce MIDI oznaczonej LP2.
2. Wyrzucić pozostałą wyjściową mieszaninę reakcyjną ERA1.
3. Na płytkę MIDI oznaczoną LP2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
4. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
5. Inkubować w podgrzanym inkubatorze do mikropórek w temperaturze 30°C przez 30 minut.
6. Natychmiast przenieść do drugiego podgrzanego inkubatora do mikropórek.
7. Inkubować w temperaturze 72°C przez 20 minut.
8. Pozostawić płytkę MIDI oznaczoną LP2 w niskiej temperaturze przez 5 minut.

Ligacja adapterów

W tym procesie następuje ligacja adapterów z końcami fragmentów cDNA i/lub gDNA.

Test TSO Comprehensive (EU) obejmuje adaptory SUA1 i UMI.

- Adapterów SUA1 należy używać z próbkami RNA.
- Adapterów UMI należy używać z próbkami DNA.

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - ALB1 – wymieszać na wytrząsarce typu wortex przez co najmniej 10 sekund, a następnie krótko odwirować.

- LIG3 – krótko odwirować, a następnie wymieszać, pipetując. Utrzymywać niską temperaturę.
- SUA1 – wymieszać na wytrząsarce typu wortex przez co najmniej 10 sekund, a następnie krótko odwirować.
- UMI – wymieszać na wytrząsarce typu wortex przez co najmniej 10 sekund, a następnie krótko odwirować.
- STL – odłożyć do wykorzystania podczas procedury.

Procedura

1. Wyjąć płytkę MIDI oznaczoną LP2 z kąpieli lodowej lub odpowiednika.
2. Dodać 60 µl odczynnika ALB1 do każdego dołka na próbkę na płytce MIDI oznaczonej LP2. ALB1 jest roztworem lepkim. Pipetować powoli, aby zminimalizować tworzenie się pęcherzyków.
3. Dodać 5 µl odczynnika LIG3 do każdego dołka na próbkę.
4. Dodać adaptery w następujący sposób.
Nie łączyć różnych rodzajów adapterów.
 - **[Dołki na próbki RNA]** – dodać 10 µl odczynnika SUA1 (niebieska nakrętka) do każdej próbki uzyskanej z RNA.
 - **[Dołki na próbki DNA]** – dodać 10 µl odczynnika UMI (biała nakrętka) do każdej próbki uzyskanej z DNA.
5. Na płytkę MIDI oznaczoną LP2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
6. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
7. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
8. Odczynnik STL wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.
9. Dodać 5 µl odczynnika STL do każdego dołka na próbkę na płytce MIDI oznaczonej LP2.
10. Na płytkę MIDI oznaczoną LP2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
11. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.

Oczyszczanie po ligacji

Ten proces wykorzystuje odczynnik SPB do oczyszczania zligowanych z adapterami fragmentów cDNA lub gDNA i usuwa niepożądane produkty. Kulki są dwukrotnie przemywane świeżo sporządzonym 80% roztworem etanolu. Próbkę zligowaną z adapterami są poddawane elucji z użyciem RSB.

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - SPB – upewnić się, że kulki pozostawały w temperaturze pokojowej przez 30 minut.

- RSB – odstawić do wykorzystania podczas procedury.
2. Przygotować świeży 80% roztwór EtOH w probówce stożkowej o poj. 15 ml lub 50 ml.

Tabela 22 Przygotować świeży 80% roztwór etanolu

Odczynnik	4 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
100% EtOH, czysty	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Woda pozbawiona RNaz/DNaz	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Świeżo sporządzony 80% roztwór EtOH wymieszać na wytrząsarce typu worteks.
4. Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

1. Odczynnik SPB wymieszać na wytrząsarce typu worteks przez 1 minutę, aby rozprzecznić kulki w zawiesinie.
2. Niezwłocznie dodać 112 µl odczynnika SPB do każdego dołka na bibliotekę na płytce MIDI oznaczonej LP2. W przypadku korzystania z korytka do dozowania należy uwzględnić nadmiar odczynnika SPB wynoszący 1,15, aby podczas pipetowania dysponować wystarczającą ilością materiału na próbkę. Po dodaniu odczynnika SPB do każdego dołka na próbkę wyrzucić wszelkie resztki materiału.
3. Na płytkę MIDI oznaczoną LP2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
4. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
5. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
6. Umieścić płytkę MIDI oznaczoną LP2 na statywie magnetycznym na 10 minut.
7. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl, aby usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka na próbkę.

Przemywanie

1. Przemywać kulki zgodnie w następujący sposób.
 - a. Pozostawić płytkę MIDI oznaczoną LP2 na statywie magnetycznym i dodać 200 µl świeżo sporządzonego 80% roztworu EtOH do każdego dołka na próbkę.
 - b. Odczekać 30 sekund.
 - c. Bez naruszania osadu kulek za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka na próbkę.
2. Przemyć kulki po raz **drugi**.
3. Użyć pipety z końcówkami kapilarnymi, aby usunąć pozostałości EtOH z każdego dołka.
4. Wyrzucić niewykorzystany 80% roztwór EtOH.

Elucja

1. Usunąć płytkę MIDI oznaczoną LP2 ze statywu magnetycznego.
2. Wymieszać odczynnik RSB przez odwracanie lub użycie wytrząsarki typu wortex.
3. Dodać 27,5 µl odczynnika RSB do każdego dołka na próbkę.
4. Na płytkę MIDI oznaczoną LP2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
5. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
6. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
7. Umieścić płytkę MIDI oznaczoną LP2 na statywie magnetycznym na 2 minuty.
8. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę do PCR jako LS (Próbki bibliotek).
9. Przenieść 25 µl każdego eluatu z płytki MIDI oznaczonej LP2 do odpowiedniego dołka na płycie do PCR oznaczonej jako LS.
10. Wyrzucić pustą płytkę MIDI oznaczoną LP2.

Indeksowanie PCR

Na tym etapie fragmenty biblioteki są amplifikowane przy użyciu starterów, które dodają sekwencje indeksujące na potrzeby multipleksowania próbki. Produkt końcowy zawiera kompletną bibliotekę fragmentów cDNA i/lub DNA flankowanych przez adaptory wymagane do generacji klastrów.

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - EPM – utrzymywać w niskiej temperaturze.
 - UPxx – wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować. UPxx to starter indeksujący wybrany podczas konfiguracji przebiegu na ekranie Create Run (Utwórz przebieg) w Local Run Manager.
 - CPxx – wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować. CPxx to starter indeksujący wybrany podczas konfiguracji przebiegu na ekranie Create Run (Utwórz przebieg) w Local Run Manager.
2. Upewnić się, że indeksy dla każdej próbki są zgodne z przebiegiem zaplanowanym w Moduł analityczny TSO Comprehensive (EU) podczas konfiguracji przebiegu. Przestrzegać instrukcji dotyczących wyboru indeksów w części [Liczba bibliotek i wybieranie indeksów na stronie 36](#).



PRZESTROGA

Niezgodności między próbkami i starterami indeksującymi powodują zgłaszanie nieprawidłowych wyników z powodu niemożności identyfikacji próbki dodatniej.

Procedura

1. Dodać 5 µl odpowiedniego startera indeksującego (UPxx lub CPxx) do odpowiedniego dołka na próbkę na płytce do PCR oznaczonej LS zgodnie z wybranymi indeksami.



PRZESTROGA

W danym momencie należy używać i otwierać tylko jedną probówkę ze starterem indeksującym. Każdą probówkę ze starterem indeksującym należy ponownie zamknąć nową nakrętką bezpośrednio po użyciu. Nie łączyć starterów indeksujących.

2. Odczynnik EPM wymieszać na wytrząsarce typu wortex przez 5 sekund, a następnie krótko odwirować.
3. Dodać 20 µl odczynnika EPM do każdego dołka na próbkę.
4. Na płytkę do PCR oznaczoną LS nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
5. Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 1 minutę.
6. Odłożyć odczynniki stosowane przed amplifikacją do miejsca przechowywania.



PRZESTROGA

Wszystkie kolejne czynności należy wykonywać w strefie pracy z produktami amplifikacji, aby zapobiec przeniesieniu produktu amplifikacji.

7. Odwirować płytkę do PCR oznaczoną LS z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
8. Umieścić na wstępnie zaprogramowanym termocyklerze przeznaczonym do pracy na etapie po amplifikacji i uruchomić program I-PCR.
Patrz [Programowanie termocyklorów na stronie 43](#).
W przypadku kontynuowania procedury od etapu [Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji na stronie 60](#) należy przestrzegać instrukcji dotyczących rozmrażania odczynników podanych w części Przygotowanie etapów protokołu.
9. Po zakończeniu programu I-PCR odwirować płytkę do PCR oznaczoną LS z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
10. Ponownie oznaczyć płytkę jako ALS (Próbki bibliotek po amplifikacji).

PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY

W przypadku wstrzymania procedury płytkę do PCR oznaczoną ALS należy przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 30 dni.

Przygotowanie do realizacji protokołu

Przygotowanie to jest wymagane do wykonania kroków protokołu prowadzących do hybrydyzacji przez noc.

1. Upewnić się, że ustawione są programy termocyklera po amplifikacji. Patrz [Programowanie termocyklarów na stronie 43](#).
2. Wyjąć próbki z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
TCB1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji

Tabela 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
TCA1	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji

Tabela 25 TruSight Oncology Comp Content Set Box (nr kat. 20031122)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
OPR1 (czerwona nakrętka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji
OPD2 (biała nakrętka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji

Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji

Podczas tego procesu pula oligonukleotydów ulega hybrydyzacji do bibliotek cDNA, a pula oligonukleotydów ulega hybrydyzacji do bibliotek gDNA przygotowanych podczas etapu [Indeksowanie PCR na stronie 58](#).

Wzbogacenie regionów docelowych wymaga dwóch etapów hybrydyzacji. Podczas pierwszej hybrydyzacji oligonukleotydy ulegają hybrydyzacji do bibliotek cDNA i/lub gDNA przez noc (od 8 do 24 godzin).

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - TCB1 – ogrzewać próbkę w temperaturze 37°C przez 5 minut. Wymieszać na wstrząsarce typu worteks przez 10 sekund, a następnie krótko odwirować.

- TCA1 – wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.
 - OPR1 – wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.
 - OPD2 – wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.
2. Jeśli płytkę do PCR oznaczoną ALS przechowywano, należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej, a następnie odwirować z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę. Wymieszać poprzez pipetowanie.
 3. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę do PCR jako HYB1 (Hybrydyzacja 1).

Procedura

1. Przenieść 20 μ l każdej biblioteki cDNA i/lub gDNA z płytki do PCR oznaczonej ALS do odpowiedniego dołka na płytce do PCR oznaczonej HYB1.
2. Na płytkę do PCR oznaczoną ALS nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą i odłożyć. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
3. Sprawdzić odczynnik TCB1 pod kątem precypitacji. Jeśli stwierdza się obecność wytrąceń, ponownie ogrzać probówkę i wymieszać na wytrząsarce typu wortex, aż kryształy się rozpuszczą.
4. Dodać 15 μ l odczynnika TCB1 do każdego dołka zawierającego bibliotekę na płytce do PCR oznaczonej HYB1.
5. Dodać 10 μ l odczynnika TCA1 do każdego dołka zawierającego bibliotekę na płytce do PCR oznaczonej HYB1.
6. Dodać sondy.
Nie łączyć ze sobą różnych rodzajów sond. Dodać tylko jeden zestaw sond na dołek.
 - **[Dołki zawierające bibliotekę RNA]** – dodać 5 μ l odczynnika OPR1 (czerwona nakrętka) do każdej biblioteki opartej na RNA.
 - **[Dołki zawierające bibliotekę DNA]** – dodać 5 μ l odczynnika OPD2 (biała nakrętka) do każdej biblioteki opartej na DNA.
7. Na płytkę do PCR oznaczoną HYB1 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
8. Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
9. Umieścić w termocyklerze i uruchomić program HYB1.
Patrz [Programowanie termocyklerów na stronie 43](#).
10. Prowadzić hybrydyzację w temperaturze 57°C przez co najmniej 8 godzin, ale nie dłużej niż 24 godziny.
11. Odłożyć odczynniki do hybrydyzacji do miejsca przechowywania.
12. Płytkę do PCR oznaczoną ALS przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez okres do 30 dni.

Przygotowanie do realizacji protokołu

Przygotowanie to jest wymagane do wykonania kroków protokołu prowadzących do następnego bezpiecznego punktu zatrzymania.

Na początku 2. dnia wyjąć probówkę z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
SMB (ciemnoniebieska etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych Drugie wychwytywanie sekwencji docelowych
ET2	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych Drugie wychwytywanie sekwencji docelowych
HP3	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych Drugie wychwytywanie sekwencji docelowych Normalizacja bibliotek
TCB1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie drugiej hybrydyzacji
RSB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Drugie wychwytywanie sekwencji docelowych Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej

Tabela 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
EE2	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych Drugie wychwytywanie sekwencji docelowych Normalizacja bibliotek
EEW	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych
TCA1	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie drugiej hybrydyzacji

Tabela 28 TruSight Oncology Comp Content Set Box (nr kat. 20031122)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
OPR1 (czerwona nakrętka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie drugiej hybrydyzacji
OPD2 (biała nakrętka)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie drugiej hybrydyzacji

Pierwsze wychwytywanie sekwencji docelowych

Na tym etapie odczynnik SMB jest wykorzystywany do wychwytywania sond, które uległy hybrydyzacji do sekwencji docelowych będących przedmiotem zainteresowania. Kulki są trzykrotnie płukane odczynnikiem EEW. Wzbogacone biblioteki są poddawane elucji świeżą mieszaniną elucyjną EE2+HP3 i neutralizowane za pomocą odczynnika ET2.

Przygotowanie

- Podgrzać inkubator mikropórek z wkładką grzejącą do płytek MIDI do temperatury 57°C.
- Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - EEW – wymieszać na wytrząsarce typu worteks przez 1 minutę.
 - EE2 – wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
 - HP3 – wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
 - SMB – upewnić się, że kulki pozostawały w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Należy pamiętać, że do tej procedury należy użyć odczynnika **SMB**, a nie SPB.
 - ET2 – odłożyć do wykorzystania podczas procedury.
- Przygotować świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 w probówce mikrowirowniczej.

Tabela 29 Mieszanina elucyjna EE2+HP3 do pierwszego wychwytywania sekwencji docelowych*

Składnik mieszaniny elucyjnej	4 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* W tej tabeli uwzględniono nadmiar objętości. Więcej informacji o obliczeniach zawiera sekcja [Obsługa odczynników na stronie 35](#).

- Mieszaninę elucyjną EE2+HP3 wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować. Odstawić do wykorzystania na etapie [Elucja na stronie 65](#).
- Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako CAP1 (Wychwytywanie 1).

6. Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

1. Wyjąć płytkę do PCR oznaczoną HYB1 z termocyklera.
2. Odwirować płytkę do PCR oznaczoną HYB1 z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
3. Odczynnik SMB wymieszać na wytrząsarce typu wortex przez 1 minutę, aby rozprzecznić kulki w zawiesinie.
Jeśli osad lub osad kulek jest obecny, upewnić się, że osiągnięto temperaturę pokojową, pipetując w górę i w dół, aby uwolnić osad, a następnie wymieszać wirowo, aby ponownie zawiesić.
4. Niezwłocznie dodać 150 μ l odczynnika SMB do każdego dołka na bibliotekę na płytce MIDI oznaczonej CAP1.
W przypadku korzystania z korytka do dozowania należy uwzględnić nadmiar odczynnika SMB wynoszący 1,15, aby podczas pipetowania można było dysponować wystarczającą ilością materiału na próbkę.
5. Po dodaniu odczynnika SMB do każdego dołka na próbkę wyrzucić wszelkie resztki materiału.
6. Ustawić pipetę na objętość 50 μ l i przenieść całą objętość każdej biblioteki z płytki do PCR oznaczonej HYB1 do odpowiedniego dołka na płytce MIDI oznaczonej CAP1.
7. Wyrzucić pustą płytkę do PCR oznaczoną HYB1.
8. Na płytkę do MIDI oznaczoną CAP1 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
9. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
10. Inkubować we wstępnie podgrzanym inkubatorze do mikropiórek w temperaturze 57°C przez 25 minut.
11. Umieścić płytkę MIDI oznaczoną CAP1 na statywie magnetycznym na 2 minuty.
12. Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 μ l usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka.



PRZESTROGA

Przejsć natychmiast do następnego etapu ([Płukanie na stronie 65](#)). Nie dopuszczać do tego, aby kulki osadzały się, pozostając przez dłuższy czas bez płynu.

Płukanie

1. Przemywać kulki zgodnie z poniższym opisem.
 - a. Zdjąć płytkę MIDI oznaczoną CAP1 ze statywu magnetycznego.
 - b. Dodać 200 µl odczynnika EEW do każdego dołka.
 - c. Użyć pipety ustawionej na objętość 150 µl, pipetując co najmniej 10 razy w celu wymieszania. Upewnić się, że kulki zostały rozprowadzone w zawiesinie.
Upewnić się, że kulki się nie osadziły, delikatnie zasysając cały roztwór kulek z dołka do końcówki. Sprawdzić wzrokowo dno każdego dołka. Jeśli obecny jest osad kulek, przechylić końcówkę pipety w stronę kulek podczas płukania, aby go wzruszyć. Upewnić się, że osad kulek został w pełni zanurzony w roztworze. Roztwór powinien mieć ciemnobrązowy kolor i jednorodną konsystencję.
 - d. Na płytkę do MIDI oznaczoną CAP1 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
 - e. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
 - f. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 4 minuty.
 - g. Inkubować w inkubatorze do mikropórek w temperaturze 57°C przez 5 minut.
 - h. Umieścić płytkę MIDI oznaczoną CAP1 na statywie magnetycznym na 2 minuty.
 - i. Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka.
2. Przemyć kulki po raz **drugi**.
3. Przepłukać kulki po raz **trzeci**.
4. Użyć pipety z końcówkami kapilarnymi, aby usunąć pozostałości EEW z każdego dołka.

Elucja

1. Zdjąć płytkę MIDI oznaczoną CAP1 ze statywu magnetycznego.
2. Świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
3. Ostrożnie dodać 17 µl mieszaniny elucyjnej EE2+HP3 do każdego dołka biblioteki na płytce MIDI oznaczonej CAP1.
4. Wyrzucić pozostałą mieszaninę elucyjną EE2+HP3.
5. Na płytkę do MIDI oznaczoną CAP1 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
6. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
7. Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
8. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę do PCR jako ELU1 (Elucja 1).
9. Odczynnik ET2 wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
10. Dodać 5 µl odczynnika ET2 do odpowiedniego dołka na bibliotekę na nowej płytce do PCR oznaczonej ELU1.

11. Ostrożnie przenieść 15 µl eluatu z każdego dołka z biblioteką na płytce MIDI oznaczonej CAP1 do odpowiedniego dołka na płytce do PCR oznaczonej ELU1.
12. Wyrzucić pustą płytkę MIDI oznaczoną CAP1.
13. Na płytkę do PCR oznaczoną ELU1 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
14. Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
15. Odłożyć odczynnik EEW do miejsca przechowywania.

Przygotowanie drugiej hybrydyzacji

Na tym etapie następuje drugie wiązanie docelowych regionów wzbogaconych bibliotek cDNA i/lub gDNA z sondami wychwytyjącymi. Druga hybrydyzacja zapewnia wysoką swoistość wychwyconych regionów. Aby zapewnić optymalne wzbogacenie bibliotek, drugi etap hybrydyzacji należy prowadzić w temperaturze 57°C przez co najmniej 1,5 godziny ale nie dłużej niż 4 godziny.

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - TCB1 – ogrzewać probówkę w temperaturze 37°C przez 5 minut. Wymieszać na wytrząsarce typu worteks przez 10 sekund, a następnie krótko odwirować.
 - TCA1 – wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
 - OPR1 – wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
 - OPD2 – wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.

Procedura

1. Sprawdzić odczynnik TCB1 pod kątem precypitacji. Jeśli widoczne są krzysztály, ponownie ogrzać probówkę i mieszać na wytrząsarce typu worteks, aż się rozpuszczą.
2. Dodać 15 µl odczynnika TCB1 do każdego dołka na bibliotekę na płytce do PCR oznaczonej ELU1.
3. Dodać 10 µl odczynnika TCA1 do każdego dołka na bibliotekę.
4. Do każdego dołka dodać tę samą sondę, która została użyta podczas pierwszej hybrydyzacji. Dodać tylko jeden zestaw sond na dołek.
Nie łączyć ze sobą różnych rodzajów sond.
 - **[Dołki zawierające bibliotekę RNA]** – dodać 5 µl odczynnika OPR1 (czerwona nakrętka) do każdej biblioteki opartej na RNA.
 - **[Dołki zawierające bibliotekę DNA]** – dodać 5 µl odczynnika OPD2 (biała nakrętka) do każdej biblioteki opartej na DNA.
5. Na płytkę do PCR oznaczoną ELU1 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.

6. Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
7. Umieścić w termocyklerze i uruchomić program HYB2.
Patrz [Programowanie termocyklerów na stronie 43](#).
8. Prowadzić hybrydyzację w temperaturze 57°C przez co najmniej 1,5 godziny ale nie dłużej niż 4 godziny.
9. Odłożyć odczynniki do hybrydyzacji do miejsca przechowywania.

Drugie wychwytywanie sekwencji docelowych

Na tym etapie odczynnik SMB jest wykorzystywany do wychwytywania sond, które uległy hybrydyzacji do sekwencji docelowych będących przedmiotem zainteresowania. Kulki są jednokrotnie przemywane buforem RSB. Wzbogacone biblioteki są poddawane elucji świeżą mieszaniną elucyjną EE2+HP3 i neutralizowane za pomocą odczynnika ET2.

Przygotowanie

1. Podgrzać inkubator mikropłatek z wkładką grzejną do płytek MIDI do temperatury 57°C.
2. Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - EE2 – wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.
 - HP3 – wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować.
 - SMB – upewnić się, że kulki pozostawały w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
Należy pamiętać, że do tej procedury należy użyć odczynnika **SMB**, a nie SPB.
 - RSB – odstawić do wykorzystania podczas procedury.
 - ET2 – odłożyć do wykorzystania podczas procedury.
3. Przygotować świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 w probówce mikrowirowniczej.

Tabela 30 Mieszanina elucyjna EE2+HP3 do drugiego wychwytywania sekwencji docelowych*

Składnik mieszaniny elucyjnej	4 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* W tej tabeli uwzględniono nadmiar objętości. Więcej informacji o obliczeniach zawiera sekcja [Obsługa odczynników na stronie 35](#).

4. Wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować. Odstawić do wykorzystania na etapie [Elucja na stronie 69](#).
5. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako CAP2 (Wychwytywanie 2).
6. Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

1. Wyjąć płytkę do PCR oznaczoną ELU1 z termocyklera.
2. Odwirować płytkę do PCR oznaczoną ELU1 z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.
3. Odczynnik SMB wymieszać na wytrząsarce typu worteks przez 1 minutę, aby rozproszyc kulki w zawiesinie.
Jeśli osad lub osad kulek jest obecny, upewnić się, że osiągnięto temperaturę pokojową, pipetując w górę i w dół, aby uwolnić osad, a następnie wymieszać wirowo, aby ponownie zawiesić.
4. Niezwłocznie dodać 150 μ l odczynnika SMB do każdego dołka na bibliotekę na płytce MIDI oznaczonej CAP2.
W przypadku korzystania z korytka do dozowania należy uwzględnić nadmiar odczynnika SMB wynoszący 1,15, aby podczas pipetowania można było dysponować wystarczającą ilością materiału na próbkę.
5. Po dodaniu odczynnika SMB do każdego dołka na próbkę wyrzucić wszelkie resztki materiału.
6. Ustawić pipetę na objętość 50 μ l i przenieść całą objętość każdej biblioteki z płytki do PCR oznaczonej ELU1 do odpowiedniego dołka na płytce MIDI oznaczonej CAP2.
7. Wyrzucić pustą płytkę do PCR oznaczoną ELU1.
8. Na płytkę MIDI oznaczoną CAP2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
9. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
10. Inkubować w inkubatorze do mikropłatek w temperaturze 57°C przez 25 minut.
W przypadku kontynuowania procedury od etapu [Amplifikacja biblioteki wzbogaconej na stronie 71](#) należy przestrzegać instrukcji dotyczących rozmrażania odczynników podanych w części [Przygotowanie do realizacji protokołu](#).
11. Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
12. Utrzymywać płytkę MIDI oznaczoną CAP2 na statywie magnetycznym. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 μ l usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka.



PRZESTROGA

Przejdź natychmiast do następnego etapu ([Płukanie na stronie 68](#)). Nie dopuszczać do tego, aby kulki osadzały się, pozostając przez dłuższy czas bez płynu.

Płukanie

1. Zdjąć płytkę MIDI oznaczoną CAP2 ze statywu magnetycznego.
2. Wymieszać odczynnik RSB przez odwracanie lub użycie wytrząsarki typu worteks.
3. Dodać 200 μ l odczynnika RSB do każdego dołka.
4. Na płytkę MIDI oznaczoną CAP2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.

5. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 4 minuty.
6. Umieścić płytkę na statywie magnetycznym na 2 minuty.
7. Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka.
8. Użyć pipety z końcówkami kapilarnymi, aby usunąć pozostałości RSB z każdego dołka.

Elucja

1. Zdjąć płytkę MIDI oznaczoną CAP2 ze statywu magnetycznego.
2. Świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
3. Dodać 22 µl mieszaniny elucyjnej EE2+HP3 do każdego dołka biblioteki na płytce MIDI oznaczonej CAP2.
4. Wyrzucić pozostałą mieszaninę elucyjną EE2+HP3.
5. Na płytkę MIDI oznaczoną CAP2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
6. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
7. Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
8. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę do PCR jako ELU2 (Elucja 2).
9. Odczynnik ET2 wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
10. Dodać 5 µl odczynnika ET2 do odpowiedniego dołka na bibliotekę na nowej płytce do PCR oznaczonej ELU2.
11. Ostrożnie przenieść 20 µl eluatu z każdego dołka z biblioteką na płytce MIDI oznaczonej CAP2 do odpowiedniego dołka na płytce do PCR oznaczonej ELU2.
12. Wyrzucić pustą płytkę MIDI oznaczoną CAP2.
13. Na płytkę do PCR oznaczoną ELU2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
14. Wytrząsać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
15. Odłożyć odczynniki SMB, EE2, HP3, RSB i ET2 do miejsca przechowywania.

PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY

W przypadku wstrzymania procedury należy odwirować płytkę do PCR oznaczoną ELU2 z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 7 dni.

Przygotowanie do realizacji protokołu

Przygotowanie to jest wymagane do wykonania kroków protokołu prowadzących do następnego bezpiecznego punktu zatrzymania.

1. Przygotować pojemnik na lód lub jego odpowiednik.

2. Wyjąć probówki z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
PPC3	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Amplifikacja biblioteki wzbogaconej
EPM	Od -25°C do -15°C	Utrzymywać niską temperaturę.	Amplifikacja biblioteki wzbogaconej

Tabela 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
SPB (jasnozielona etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.	Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej
RSB	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej Przygotowanie do sekwencjonowania

Amplifikacja biblioteki wzbogaconej

Na tym etapie startery są wykorzystywane do amplifikacji wzbogaconych bibliotek.

Przygotowanie

1. Jeśli płytkę ELU2 przechowywano, należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej, a następnie odwirować z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę.

Procedura

1. Odczynnik PPC3 wymieszać na wyrzäsarce typu wortexs, a następnie krótko odwirować.
2. Dodać 5 µl odczynnika PPC3 do każdego dołka na bibliotekę na płytce do PCR oznaczonej ELU2.
3. Odczynnik EPM wymieszać na wyrzäsarce typu wortexs przez 5 sekund, a następnie krótko odwirować.
4. Dodać 20 µl odczynnika EPM do każdego dołka na bibliotekę.
5. Na płytkę do PCR oznaczoną ELU2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
6. Wyrzäszać z prędkością 1200 obr./min przez 2 minuty.
7. Umieścić w termocyklerze i uruchomić program EL-PCR.
Patrz [Programowanie termocyklerów na stronie 43](#).
W przypadku kontynuowania procedury od etapu [Normalizacja bibliotek na stronie 74](#) należy przestrzegać instrukcji dotyczących rozmrażania podanych w części [Przygotowanie do realizacji protokołu](#).
8. Odłożyć odczynniki PPC3 i EPM do miejsca przechowywania.

Oczyszczanie amplifikowanej biblioteki wzbogaconej

Na tym etapie stosuje się odczynnik SPB do oczyszczenia wzbogaconych bibliotek z niepożądanych składników reakcji. Kulki są dwukrotnie przemywane świeżo sporządzonym 80% roztworem etanolu. Biblioteki są eluowane RSB.

Przygotowanie

1. Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - SPB – upewnić się, że kulki pozostawały w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Należy pamiętać, że do tej procedury należy użyć odczynnika **SPB**, a nie SMB.
 - RSB – odstawić do wykorzystania podczas procedury.
2. Przygotować świeży 80% roztwór etanolu w probówce stożkowej o poj. 15 ml lub 50 ml.

Tabela 33 Przygotować świeży 80% roztwór etanolu

Odczynnik	4 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
100% EtOH, czysty	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Woda pozbawiona RNaz/DNaz	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Świeżo sporządzony 80% roztwór EtOH wymieszać na wyrząsarce typu wortex.
- Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę MIDI jako BIND2 (Wiązanie oczyszczonego materiału).
- Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

- Wyjąć płytkę do PCR oznaczoną ELU2 z termocyklera.
- Odwirować płytkę do PCR oznaczoną ELU2 z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę.
- Odczynnik SPB mieszać na wyrząsarce typu wortex przez 1 minutę, aby ponownie rozprowadzić kulki w zawiesinie.
- Niezwłocznie dodać 110 µl odczynnika SPB do każdego dołka na bibliotekę na płytce MIDI oznaczonej BIND2.
- Przenieść 50 µl każdej biblioteki z płytki ELU2 PCR do odpowiedniego dołka na płytce MIDI oznaczonej BIND2.
- Wyrzucić pustą płytkę do PCR oznaczoną ELU2.
- Na płytkę MIDI oznaczoną BIND2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
- Wyrzasać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
- Inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut.
- Umieścić płytkę MIDI oznaczoną BIND2 na statywie magnetycznym na 5 minut.
- Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka.

Płukanie

- Przemywać kulki zgodnie w następujący sposób.
 - Pozostawić płytkę MIDI oznaczoną BIND2 na statywie magnetycznym i dodać 200 µl świeżego 80% roztworu EtOH do każdego dołka.
 - Odczekać 30 sekund.
 - Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka.
- Przemyć kulki po raz **drugi**.

3. Użyć pipety z końcówkami kapilarnymi, aby usunąć pozostałości EtOH z każdego dołka.
4. Wyrzucić niewykorzystany 80% roztwór EtOH.

Elucja

1. Usunąć płytkę MIDI oznaczoną BIND2 ze statywu magnetycznego.
2. Wymieszać odczynnik RSB przez odwracanie lub użycie wytrząsarki typu worteks.
3. Dodać 32 µl odczynnika RSB do każdego dołka na bibliotekę.
4. Na płytkę MIDI oznaczoną BIND2 nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą. Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
5. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
6. Inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 minuty.
7. Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
8. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę do PCR jako PL (Biblioteki oczyszczone).
9. Przenieść 30 µl każdego eluatu z płytki MIDI oznaczonej BIND2 do odpowiedniego dołka na płytce do PCR oznaczonej jako PL.
10. Wyrzucić pustą płytkę MIDI oznaczoną BIND2.
11. Na płytkę do PCR oznaczoną PL nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
12. Odłożyć odczynniki SPB i RSB do miejsca przechowywania.

PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY

W przypadku wstrzymania procedury należy odwirować płytkę do PCR oznaczoną PL z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 30 dni.

Przygotowanie do realizacji protokołu

Przygotowanie to jest wymagane do wykonania kroków protokołu prowadzących do następnego bezpiecznego punktu zatrzymania.

1. Wyjąć próbówki z odczynnikiem z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
LNA1	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek
EE2	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek

Tabela 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
LNB1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzać w temperaturze pokojowej przez 30 minut.	Normalizacja bibliotek
HP3	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek Przygotowanie do sekwencjonowania
LNW1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek
LNS1	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Normalizacja bibliotek

- W przypadku kontynuowania procedury tego samego dnia od etapu [Przygotowanie do sekwencjonowania na stronie 78](#) należy przestrzegać instrukcji dotyczących rozmrażania podanych w części [Przygotowanie do realizacji protokołu](#).

Normalizacja bibliotek

W tym procesie do normalizacji ilości każdej biblioteki wykorzystywany jest odczynnik LNB1 wraz z substancjami dodatkowymi (LNA1), aby zapewnić jednolitą reprezentację biblioteki w pulach bibliotek. Kulki są dwukrotnie przemywane LNW1. Biblioteki są poddawane elucji świeżą mieszaniną elucyjną EE2+HP3 i neutralizowane za pomocą LNS1.

Przygotowanie

- Przygotować wymienione poniżej odczynniki.
 - LNB1 – upewnić się, że kulki pozostawały w temperaturze pokojowej przez 30 minut.
 - LNA1 – wymieszać na wytrząsarce typu wortexs.
 - EE2 – wymieszać na wytrząsarce typu wortexs, a następnie krótko odwirować.
 - HP3 – wymieszać na wytrząsarce typu wortexs, a następnie krótko odwirować.
 - LNW1 – wymieszać na wytrząsarce typu wortexs. Odłożyć do wykorzystania podczas procedury.
 - LNS1 – wymieszać na wytrząsarce typu wortexs. Odłożyć do wykorzystania podczas procedury.
- Odczynnik LNB1 wymieszać na wytrząsarce typu wortexs przez 1 minutę, aby rozprowadzić kulki w zawiesinie.
Odwrócić probówkę z LNB1, aby upewnić się, że wszystkie kulki zostały rozprowadzone w zawiesinie.
- Za pomocą pipety ustawionej na objętość 800 µl pipetować odczynnik LNB1 w górę i w dół 10 razy w celu przygotowania zawiesiny.

- Natychmiast przygotować świeżą wyjściową mieszaninę reakcyjną LNA1+LNB1 w probówce stożkowej.



PRZESTROGA

Całkowicie przeprowadzić w zawieszinę osad kulek LNB1 z dna próbówki, aby zapobiec tworzeniu obszarów o niejednorodnej gęstości.

Tabela 36 Wyjściowa mieszanina reakcyjna LNA1+LNB1*

Składnik wyjściowej mieszaniny reakcyjnej	4 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* W tej tabeli uwzględniono nadmiar objętości. Więcej informacji o obliczeniach zawiera sekcja [Obsługa odczynników na stronie 35](#).

- Wyjściową mieszaninę reakcyjną LNA1+LNB1 wymieszać na wytrząsarce typu wortex. Odstawić do wykorzystania na etapie [Wiązanie na stronie 75](#).
- Przygotować świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 w probówce mikrowirowniczej.

Tabela 37 Mieszanina elucyjna EE2+HP3 do normalizacji bibliotek*

Składnik mieszaniny elucyjnej	4 biblioteki	8 bibliotek	16 bibliotek	24 biblioteki	48 bibliotek
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* W tej tabeli uwzględniono nadmiar objętości. Więcej informacji o obliczeniach zawiera sekcja [Obsługa odczynników na stronie 35](#).

- Świeżą mieszaninę elucyjną wymieszać na wytrząsarce typu wortex, a następnie krótko odwirować. Odstawić do wykorzystania na etapie [Elucja na stronie 76](#).
- Jeśli płytkę do PCR oznaczoną PL przechowywano, należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej i odwirować z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę. Wymieszać poprzez pipetowanie.
- Oznaczyć nową 96-dółkową płytkę MIDI BBN (Normalizacja w oparciu o kulki).
- Wyjąć magnes.

Procedura

Wiązanie

- Wyjściową mieszaninę reakcyjną LNA1+LNB1 wymieszać na wytrząsarce typu wortex.
- Niezwłocznie dodać 45 µl wyjściowej mieszaniny reakcyjnej LNA1+LNB1 do każdego dołka z biblioteką na płytce MIDI oznaczonej BBN.
- Wyrzucić pozostałą wyjściową mieszaninę reakcyjną LNA1+LNB1.

4. Dodać 20 µl każdej biblioteki z płytki PL PCR do odpowiedniego dołka na płytce BBN MIDI.
5. Na płytkę MIDI oznaczoną BBN nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
6. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 30 minut.
7. Na płytkę do PCR oznaczoną PL nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą i odłożyć do miejsca przechowywania.
8. Umieścić płytkę MIDI oznaczoną BBN na statywie magnetycznym na 2 minuty.
9. Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka.

Płukanie

1. Przemywać kulki zgodnie w następujący sposób.
 - a. Zdjąć płytkę MIDI oznaczoną BBN ze statywu magnetycznego.
 - b. Dodać 45 µl odczynnika LNW1 do każdego dołka na bibliotekę.
 - c. Na płytkę MIDI oznaczoną BBN nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
 - d. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 5 minut.
 - e. Umieścić płytkę MIDI oznaczoną BBN na statywie magnetycznym na 2 minuty.
 - f. Utrzymywać płytkę na statywie magnetycznym. Bez naruszania osadu kulek, za pomocą pipety ustawionej na objętość 200 µl usunąć i odrzucić cały nadsącz z każdego dołka.
2. Przemyć kulki po raz *drugi*.
3. Użyć pipety z końcówkami kapilarnymi, aby usunąć pozostałości nadsączu z każdego dołka.

Elucja

1. Zdjąć płytkę MIDI oznaczoną BBN ze statywu magnetycznego.
2. Świeżą mieszaninę elucyjną EE2+HP3 wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
3. Dodać 32 µl roztworu EE2+HP3 do każdego dołka z biblioteką na płytce MIDI oznaczonej BBN.
4. Wyrzucić pozostałą mieszaninę elucyjną.
5. Na płytkę MIDI oznaczoną BBN nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
6. Wytrząsać z prędkością 1800 obr./min przez 2 minuty.
7. Umieścić na statywie magnetycznym na 2 minuty.
8. Oznaczyć nową 96-dołkową płytkę do PCR jako NL (Biblioteki znormalizowane).
9. Ostrożnie przenieść 30 µl eluatu z każdego dołka z biblioteką na płytce MIDI oznaczonej BBN do odpowiedniego dołka na płytce do PCR oznaczonej NL.



PRZESTROGA

Jeśli kulki zostaną zassane do końcówek pipet, należy wypchnąć je z powrotem na płytkę stojącą na statywie magnetycznym i odczekać, aż ciecz stanie się klarowna (ok. 2 minuty) przed przejściem do kolejnego etapu procedury.

10. Wyrzucić pustą płytkę MIDI oznaczoną BBN.
11. Odczynnik LNS1 wymieszać na wytrząsarce typu worteks.
12. Dodać 30 µl odczynnika LNS1 do każdego dołka zawierającego bibliotekę na płytce do PCR oznaczonej NL.
13. Wymieszać, pipetując pięć razy.
14. Na płytkę do PCR oznaczoną NL nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
15. Odłożyć odczynniki LNB1, LNA1, EE2, LNW1 i LNS1 do miejsca przechowywania.

PUNKT BEZPIECZNEGO WSTRZYMANIA PROCEDURY

W przypadku wstrzymania procedury należy odwirować płytkę do PCR oznaczoną NL z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C przez maksymalnie 32 dni.

Przygotowanie do realizacji protokołu

Przygotowanie to jest wymagane do wykonania kroków protokołu prowadzących do sekwencjonowania.

Rozpocząć przygotowanie materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania z zestawu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (nr kat. 20028871) co najmniej na godzinę przed użyciem.

- Wyjąć bufor do rozcieńczeń biblioteki (HT1) z miejsca przechowywania w temperaturze od -25°C do -15°C. Rozmrozić do temperatury pokojowej. Po rozmrożeniu trzymać w chłodzie.
- Postępować zgodnie z instrukcjami przygotowania podanymi w *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx Instrument (nr dokumentu: 1000000009513)* dla innych materiałów eksploatacyjnych zestawu.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cykli)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cykli)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cykli)
- Wyjąć próbki z odczynnikami z opakowania i postępować zgodnie z instrukcjami dotyczącymi rozmrażania.

Tabela 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (nr kat. 20031121)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
Kontrola wewnętrzna PhiX (PX3 lub PhiX)	Od -25°C do -15°C	Rozmrozić do temperatury pokojowej. Po rozmrożeniu trzymać w chłodzie.	Przygotowanie do sekwencjonowania

Tabela 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (nr kat. 20031123)

Odczynnik	Przechowywanie	Instrukcje dotyczące rozmrażania	Etap protokołu
HP3	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie do sekwencjonowania
RSB (różowa etykieta)	Od 2°C do 8°C	Doprowadzić do temperatury pokojowej.	Przygotowanie do sekwencjonowania

Przygotowanie do sekwencjonowania

Każdy przebieg sekwencjonowania DNA i RNA powinien obejmować kontrolę dodatnią oraz kontrolę NTC. Kontrole NTC dla DNA i RNA są sekwencjonowane wielokrotnie według potrzeb tak, aby każdy przebieg zawierał kontrolę NTC. Każdy przebieg DNA i RNA obejmuje osobną kontrolę dodatnią.

Przygotowanie

1. Postępować zgodnie z wytycznymi w części [Liczba bibliotek i wybieranie indeksów na stronie 36](#).
2. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą jako dHP3 (Rozcieńczony HP3).
3. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą jako dPhiX (rozcieńczony PhiX).
4. Podgrzać blok grzejny dla probówek mikrowiorniczych do temperatury 96°C.
5. Przygotować pojemnik na lód lub jego odpowiednik.

Rozcieńczanie i denaturacja kontroli PhiX

1. Odczynnik HP3 wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
2. W mikroprobówce wiorniczej zawierającej dHP3 należy wymieszać podane poniżej objętości.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl wody pozbawionej-RNas/DNas
3. Zawartość próbki z dHP3 wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
4. Wymieszać odczynnik RSB przez odwracanie lub użycie wytrząsarki typu worteks.
5. Kontrolę PhiX wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
6. W mikroprobówce wiorniczej zawierającej dPhiX należy wymieszać podane poniżej objętości.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl kontroli PhiX
7. Dodać 10 µl dHP3 do próbki z dPhiX.
8. Wyrzucić probówkę z dHP3.
9. Zawartość próbki z dPhiX wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
10. Inkubować dPhiX w temperaturze pokojowej przez 5 minut w celu denaturacji.
11. Odczynnik HT1 wymieszać na wytrząsarce typu worteks.
12. Niezwłocznie dodać 980 µl wstępnie schłodzonego odczynnika HT1 do próbki z dPhiX.
13. Wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
14. Utrzymywać probówkę z PhiX w niskiej temperaturze aż do momentu użycia do przygotowania drugiego rozcieńczenia.
Stężenie końcowe wynosi 20 pM dPhiX.
15. Odłożyć odczynniki PhiX, HP3 i RSB do miejsca przechowywania.

Pulowanie i denaturacja bibliotek TSO Comprehensive (EU)

1. Jeśli płytkę do PCR oznaczoną NL przechowywano, należy doprowadzić ją do temperatury pokojowej, a następnie odwirować z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę i wymieszać, pipetując.

2. Używając pipety wielokanałowej ustawionej na objętość 30 µl, delikatnie wymieszać biblioteki na płytce do PCR oznaczonej NL, pipetując je pięć razy.

Dla każdej biblioteki należy użyć świeżych końcówek.



PRZESTROGA

W celu uzyskania optymalnej wydajności należy upewnić się, że biblioteki zostały dobrze wymieszane.

3. Wybrać jedną z poniższych opcji w celu pulowania, denaturowania i rozcieńczania bibliotek.
 - **[Opcja 1]:** jednoczesne sekwencjonowanie bibliotek pochodzących z próbek RNA i próbek DNA. Patrz [Opcja 1: Biblioteki DNA i RNA razem na stronie 80](#)
 - **[Opcja 2]:** sekwencjonowanie wyłącznie bibliotek pochodzących z próbek DNA. Patrz [Opcja 2: Biblioteki tylko DNA na stronie 81](#).
 - **[Opcja 3]:** sekwencjonowanie wyłącznie bibliotek pochodzących z próbek RNA. Patrz [Opcja 3: Biblioteki tylko RNA na stronie 82](#).

Opcja 1: Biblioteki DNA i RNA razem

1. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą jako PRL (Spulowane biblioteki RNA).
2. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą jako PDL (Spulowane biblioteki DNA).
3. Przenieść 10 µl każdej znormalizowanej biblioteki RNA (cDNA) z płytki NL do probówki PRL.
Nie pulować dwóch bibliotek z tym samym starterem indeksującym.
4. Przenieść 10 µl każdej znormalizowanej biblioteki DNA z płytki NL do probówki PDL.
Nie pulować dwóch bibliotek z tym samym starterem indeksującym.
5. Na płytkę do PCR oznaczoną NL nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
6. Probówki PRL i PDL wymieszać na wstrząsarce typu worteks.
7. Probówki PRL i PDL krótko odwirować.
8. Probówki PRL i PDL inkubować w bloku grzejnym w temperaturze 96°C przez 2 minuty.
9. Probówki PRL i PDL utrzymywać w niskiej temperaturze przez 5 minut.
10. Probówki PRL i PDL wymieszać na wstrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
11. Probówki PRL i PDL utrzymywać w niskiej temperaturze.

Przygotowanie pierwszego rozcieńczenia

1. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą jako DIL1 (Rozcieńczenie 1).
2. Przenieść 20 µl PDL do pustej probówki DIL1.
3. Dodać 5 µl PRL do probówki DIL1.
4. Wyrzucić probówki PDL i PRL.

5. Dodać 475 µl wstępnie schłodzonego HT1 do próbki DIL1 (rozcieńczenie 1:20).
6. Wymieszać zawartość próbki DIL1 na wyrzäsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.

Przygotowanie drugiego rozcieńczenia

1. Oznaczyć próbkę mikrowiorniczą o poj. 2,0 ml jako DIL2 (Rozcieńczenie 2).
2. Przenieść 40 µl DIL1 do pustej próbki DIL2.
3. Wyrzucić próbkę DIL1.
4. Dodać 1660 µl wstępnie schłodzonego HT1 do próbki DIL2 (rozcieńczenie 1:850).
5. Wymieszać przygotowany do zmieszania roztwór 20 pM dPhiX na wyrzäsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
6. Dodać 2,5 µl przygotowanego roztworu 20 pM dPhiX do próbki DIL2.
7. Wymieszać na wyrzäsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
8. Załadować 1300 µl DIL2 do rozmrożonej kasety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cykli).
Więcej informacji można znaleźć w sekcji *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx Instrument* (nr dokumentu: 1000000009513).
9. Wyrzucić próbkę DIL2.
10. Odwirować płytkę do PCR oznaczoną NL z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę i przechowywać ją w temperaturze od -25°C do -15°C do 32 dni.
11. Przejść do sekwencjonowania.
Więcej informacji można znaleźć w sekcji *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx Instrument* (nr dokumentu: 1000000009513).

Opcja 2: Biblioteki tylko DNA

1. Oznaczyć próbkę mikrowiorniczą jako PDL (Spulowane biblioteki DNA).
2. Przenieść 10 µl każdej znormalizowanej biblioteki DNA z płytki NL do próbki PDL.
Nie pulować dwóch bibliotek z tym samym starterem indeksującym.
3. Na płytkę do PCR oznaczoną NL nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki.
4. Probówkę PDL wymieszać na wyrzäsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
5. Probówkę PDL inkubować w bloku grzejnym w temperaturze 96°C przez 2 minuty.
6. Probówkę PDL utrzymywać w niskiej temperaturze przez 5 minut.
7. Probówkę PDL wymieszać na wyrzäsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
8. Probówkę PDL utrzymywać w niskiej temperaturze.

Przygotowanie pierwszego rozcieńczenia

1. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą jako DIL1 (Rozcieńczenie 1).
2. Przenieść 10 µl PDL do pustej probówki DIL1.
3. Wyrzucić probówkę PDL.
4. Dodać 190 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki DIL1 (rozcieńczenie 1:20).
5. Wymieszać DIL1 na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.

Przygotowanie drugiego rozcieńczenia

1. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą o poj. 2,0 ml jako DIL2 (Rozcieńczenie 2).
2. Przenieść 40 µl DIL1 do pustej probówki DIL2.
3. Wyrzucić probówkę DIL1.
4. Dodać 1660 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki DIL2 (rozcieńczenie 1:850).
5. Wymieszać przygotowany roztwór 20 pM dPhiX na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
6. Dodać 2,5 µl przygotowanego roztworu 20 pM dPhiX do probówki DIL2.
7. Wymieszać na wytrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
8. Załadować 1300 µl DIL2 do rozmrożonej kasety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cykli).
Więcej informacji można znaleźć w sekcji *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx Instrument* (nr dokumentu: 1000000009513).
9. Wyrzucić probówkę DIL2.
10. Odwirować płytkę do PCR oznaczoną NL z przyspieszeniem $280 \times g$ przez 1 minutę i przechowywać ją w temperaturze od -25°C do -15°C do 32 dni.
11. Przejść do sekwencjonowania.
Więcej informacji można znaleźć w sekcji *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx Instrument* (nr dokumentu: 1000000009513).

Opcja 3: Biblioteki tylko RNA

1. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą jako PRL (Spulowane biblioteki RNA).
2. Przenieść 10 µl każdej znormalizowanej biblioteki RNA (cDNA) z płytki NL do probówki PRL.
Nie pulować dwóch bibliotek z tym samym starterem indeksującym.
3. Na płytkę do PCR oznaczoną NL nałożyć samoprzylepną folię uszczelniającą.
Dokładnie uszczelnić krawędzie i dołki, aby zapobiec parowaniu.
4. Probówkę PRL wymieszać na wytrząsarce typu worteks.
5. Probówkę PRL krótko odwirować.
6. Inkubować probówkę PRL w bloku grzejącym w temperaturze 96°C przez 2 minuty.

7. Probówkę PRL utrzymywać w niskiej temperaturze przez 5 minut.
8. Probówkę PRL wymieszać na wyrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
9. Probówkę PDL utrzymywać w niskiej temperaturze.

Przygotowanie pierwszego rozcieńczenia

1. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą jako DIL1 (Rozcieńczenie 1).
2. Przenieść 10 µl PRL do pustej probówki DIL1.
3. Wyrzucić probówkę PRL.
4. Dodać 190 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki DIL1 (rozcieńczenie 1:20).
5. Wymieszać DIL1 na wyrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.

Przygotowanie drugiego rozcieńczenia

1. Oznaczyć probówkę mikrowiorniczą o poj. 2,0 ml jako DIL2 (Rozcieńczenie 2).
2. Przenieść 40 µl DIL1 do pustej probówki DIL2.
3. Wyrzucić probówkę DIL1.
4. Dodać 1646 µl wstępnie schłodzonego HT1 do probówki DIL2 (rozcieńczenie 1:843).
5. Wymieszać przygotowany roztwór 20 pM dPhiX na wyrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
6. Dodać 16,7 µl przygotowanego 20 pM roztworu dPhiX do probówki DIL2.
7. Wymieszać na wyrząsarce typu worteks, a następnie krótko odwirować.
8. Załadować 1300 µl DIL2 do rozmrożonej kasety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cykli).

Więcej informacji można znaleźć w sekcji *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx Instrument* (nr dokumentu: 1000000009513).

9. Wyrzucić probówkę DIL2.
10. Odwirować płytkę do PCR oznaczoną NL z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę i przechowywać w temperaturze od -25°C do -15°C do 32 dni.
11. Przejść do sekwencjonowania.

Więcej informacji można znaleźć w sekcji *Instrukcja obsługi aparatu NextSeq 550Dx Instrument* (nr dokumentu: 1000000009513).

Interpretacja wyników

Wyniki sekwencjonowania z testu TSO Comprehensive (EU) są podawane dla każdej próbki osobno w raporcie PDF i raporcie JSON. Na poziomie próbki generowany jest również raport Low Depth (`LowDepthReport.tsv`).

Na poziomie przebiegu generowane są również następujące pliki wyjściowe:

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

W raportach PDF i JSON pojawiają się tylko warianty, które przeszły kontrolę jakości.

Szczegółowe informacje na temat analizy można znaleźć w *Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module* (nr dokumentu: 200008661).

Wyniki diagnostyki uzupełniającej

Dla każdego przewidzianego zastosowania diagnostyki uzupełniającej (CDx) istnieją trzy możliwe wyniki:

- **Dodatni** – wariant lub biomarker wykryto i sklasyfikowano na poziomie 1 (CDx).
- **Nie wykryto** – W próbce nie wykryto żadnych wariantów ani biomarkerów związanych z przewidzianym zastosowaniem diagnostyki uzupełniającej. Rodzaj guza wybrany dla próbki nadaje się do diagnostyki uzupełniającej.
- **Brak wyniku** – Określenie statusu wariantu nie jest możliwe z jednego lub kilku następujących powodów:
 - Przewidziane zastosowanie diagnostyki uzupełniającej nie dotyczy badanej próbki, ponieważ rodzaj guza wybrany dla próbki nie odpowiada rodzajowi nowotworu objętego diagnostyką uzupełniającą.
 - Seria sekwencjonowania nie spełniła warunków kontroli jakości.
 - Biblioteka nie spełniła wymaganych warunków kontroli jakości.
 - Poddano analizie nieodpowiedni kwas nukleinowy.

Wszystkie wyniki zgodne z zastosowaniem diagnostyki uzupełniającej są raportowane w sekcji Wyniki diagnostyki uzupełniającej raportu JSON. Jedynie zgodne zastosowania z wynikiem dodatnim są wymienione w sekcji Wyniki diagnostyki uzupełniającej raportu w formacie PDF.

Warianty służące do profilowania nowotworu

Test TSO Comprehensive (EU) jest przeznaczony do zgłaszania wariantów somatycznych wraz ze zgłaszaniem wariantów o potwierdzonym znaczeniu klinicznym lub wariantów o potencjalnym znaczeniu klinicznym. Oprogramowanie testu TSO Comprehensive (EU) wykorzystuje bibliotekę KB, która określa, czy każdy wykryty i kwalifikujący się wariant ([Tabela 2](#)) jest klinicznie istotny lub potencjalnie klinicznie istotny na podstawie

powiązań terapeutycznych, diagnostycznych lub prognostycznych. Biblioteka KB uwzględnia również, czy w badanym rodzaju guza istnieją (lub nie istnieją) powiązania. Powiązania z podatnością lub ryzykiem rozwoju nowotworu nie są uwzględniane w bibliotece KB. Często występujące polimorfizmy są usuwane.

W przypadku wariantów służących do profilowania guza wyniki dodatkowo są klasyfikowane jako wyniki badania genomu o potwierdzonym znaczeniu klinicznym (poziom 2) lub wyniki badania genomu o potencjalnym znaczeniu klinicznym (poziom 3) zgodnie z zainstalowaną biblioteką KB i zidentyfikowanym rodzajem guza.

Niespełnienie warunków kontroli jakości skutkuje brakiem wyników dla typów wariantów, które są istotne dla metryki kontroli jakości, której warunków nie spełniono. Więcej informacji można znaleźć w [Tabela 40](#) i [Tabela 41](#). Miejsca o niewystarczającej głębokości pokrycia podczas profilowania nowotworu są wymienione w raporcie Mała głębokość, a nie w raporcie TSO Comprehensive (EU).

Kontrola jakości

- Informacje na temat ilościowego oznaczania kwasów nukleinowych oraz minimalnych wymagań dotyczących materiału wejściowego zawiera część [Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28](#).
- Sekwencjonowanie i ważność próbki są ustalane automatycznie i zgłaszane przez Moduł analityczny TSO Comprehensive (EU). Szczegółowe informacje na temat analizy można znaleźć w *Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (nr dokumentu: 200008661)*.
- Raport TSO Comprehensive (EU), dostępny w formatach PDF i JSON, podsumowuje wyniki kontroli jakości. Pliki raportu znajdują się w folderze analizy. Lokalizacja folderu analizy (zawierającego raporty PDF i JSON) oraz folderu przebiegu znajduje się w *Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (nr dokumentu: 200008661)*.

Tabela 40 Metryki kontroli jakości wyników podanych w raporcie z testu TSO Comprehensive (EU)

Typ wyniku	Metryka	Specyfikacja	Opis	Wpływ niezgodności ze specyfikacją*
Sekwencjonowanie	PCT_PF_READS (%)	≥80,0	Odsetek odczytów przechodzących przez filtr (PF).	Sekwencjonowanie zostało unieważnione. Nie zgłoszono żadnych wyników dla żadnej próbki w przebiegu.

Typ wyniku	Metryka	Specyfikacja	Opis	Wpływ niezgodności ze specyfikacją*
	PCT_Q30_R1 (%)	≥80,0	Średni odsetek rozpoznawania nukleotydów z wynikiem jakościowym Q30 lub wyższym w przypadku parametru Read 1 (Odczyt 1).	Sekwencjonowanie zostało unieważnione. Nie zgłoszono żadnych wyników dla żadnej próbki w przebiegu.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥80,0	Średni odsetek rozpoznawania nukleotydów z wynikiem jakościowym Q30 lub wyższym w przypadku parametru Read 2 (Odczyt 2).	

Typ wyniku	Metryka	Specyfikacja	Opis	Wpływ niezgodności ze specyfikacją*
Biblioteki DNA	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 lub > 3106 PRZY WARTOŚCI $P \leq 0,049$	Metryka oceniająca prawdopodobieństwo zanieczyszczenia na podstawie wartości VAF w częstych wariantach. Wynik oceny zanieczyszczenia opiera się na rozkładzie VAF w SNP. Wartość P zanieczyszczenia jest wykorzystywana do oceny genomów o wysokim stopniu rearanżacji. Ma to zastosowanie tylko wtedy, gdy wynik zanieczyszczenia jest wyższy niż górna granica specyfikacji.	Brak wyników dotyczących DNA.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Mediana długości fragmentu w próbce.	Brak wyników dotyczących TMB lub małych wariantów DNA.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (liczba)	≥ 150	Mediana dopasowania fragmentu eksonu spośród wszystkich zasad w rejonie eksonu.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Odsetek nukleotydów w rejonie eksonu z 50X pokryciem fragmentów.	

Typ wyniku	Metryka	Specyfikacja	Opis	Wpływ niezgodności ze specyfikacją*
	USABLE_MSI_SITES (liczba)	≥ 40	Liczba miejsc MSI użytecznych do rozpoznania MSI (liczba miejsc mikrosatelitarnych z zakresami odczytu wystarczającymi do zidentyfikowania niestabilności mikrosatelitarnej).	Brak wyników dotyczących MSI.
	COVERAGE_MAD (liczba)	$\leq 0,210$	Mediana bezwzględnych odchyleń od mediany znormalizowanej liczby każdego regionu docelowego CNV.	Brak wyników dotyczących amplifikacji genów.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (count)	$\geq 1,0$	Mediana liczby nieprzetworzonych przedziałów na docelowy wariant CNV.	
Biblioteki RNA	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Mediana długości fragmentu w próbce.	Brak wyników dotyczących fuzji lub wariantów splicingowych.

Typ wyniku	Metryka	Specyfikacja	Opis	Wpływ niezgodności ze specyfikacją*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (współczynnik)	$\leq 0,93$	Metryka MEDIAN_CV_GENE_500X jest miarą jednorodności pokrycia. W przypadku każdego genu z pokryciem przynajmniej 500x obliczany jest współczynnik zmienności pokrycia w całym genie. Ta metryka jest medianą tych wartości. Wysoka wartość wskazuje na wysoki poziom zmienności i sygnalizuje problem przy przygotowaniu biblioteki, na przykład niski poziom wejściowy próbki i/lub problemy z wiązaniem sondy (ang. probe pulldown). Ta metryka jest obliczana z wykorzystaniem wszystkich odczytów (w tym tych oznaczonych jako zduplikowane).	

Typ wyniku	Metryka	Specyfikacja	Opis	Wpływ niezgodności ze specyfikacją*
	TOTAL_ON_TARGET_READS (liczba)	$\geq 9\,000\,000$	Łączna liczba odczytów zmapowanych w regionach docelowych. Ta metryka jest obliczana z wykorzystaniem wszystkich odczytów (w tym tych oznaczonych jako zduplikowane).	

* W przypadku skutecznie uzyskanych wyników pojawia się komunikat PASS.

Tabela 41 Metryki kontroli wyników podanych w raporcie z testu TSO Comprehensive (EU)

Typ wyniku	Metryka	Specyfikacja	Wpływ niezgodności ze specyfikacją*
Kontrola dodatnia	Zewnętrzna kontrola DNA	Wykryto 23 z 24 określonych wariantów	Należy ręcznie unieważnić próbki pacjentów na podstawie wyników próbek kontrolnych. Oprogramowanie modułu analizy nie unieważnia automatycznie próbek pacjentów na podstawie wyników próbek kontrolnych.
	Zewnętrzna kontrola RNA	Wykryto 12 z 13 określonych wariantów	
Kontrola bez matrycy	Mediana pokrycia eksonów DNA dla TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Należy ręcznie unieważnić próbki pacjentów na podstawie wyników próbek kontrolnych. Oprogramowanie modułu analizy nie unieważnia automatycznie próbek pacjentów na podstawie wyników próbek kontrolnych.
	Wartość odcięcia genów powyżej mediany, RNA	≤ 1	

* W przypadku skutecznie uzyskanych wyników pojawia się komunikat PASS.

- Nieprawidłowe sekwencjonowanie należy powtórzyć.
- Testy bibliotek, które dały następujące wyniki, należy powtórzyć:
 - Zanieczyszczone biblioteki DNA
 - Nieprawidłowe biblioteki RNA

- Testy można powtórzyć, aby uzyskać więcej wyników dotyczących wariantów lub biomarkerów w przypadku bibliotek DNA, które zostały unieważnione dla jednego, ale nie dla wszystkich typów wariantów.
- Kontrole dodatkowo są oceniane pod kątem rozpoznawania wariantów. Jeśli kontrole dodatkowo nie spełniają specyfikacji rozpoznania wariantu, należy ręcznie unieważnić sekwencjonowanie. Oprogramowanie modułu analizy nie unieważnia automatycznie próbek pacjentów na podstawie wyników próbek kontrolnych.
- Kontrole NTC są oceniane względem mediany pokrycia eksonów dla DNA i genów powyżej mediany wartości granicznej dla RNA. Jeśli kontrole ujemne nie spełniają specyfikacji, należy ręcznie unieważnić zdarzenie przygotowania biblioteki i powiązane sekwencjonowanie. Oprogramowanie modułu analizy nie unieważnia automatycznie próbek pacjentów na podstawie wyników próbek kontrolnych.
- Dodatkowe czynności wymagane w związku z kontrolą jakości należy przeprowadzić zgodnie z przepisami lokalnymi, stanowymi i/lub federalnymi oraz warunkami akredytacji.

Więcej informacji na temat powtarzania przebiegów sekwencjonowania lub testów bibliotek zawiera część [Rozwiązywanie problemów na stronie 92](#).

Rozwiązywanie problemów

Aby rozwiązać problemy powstałe w przebiegu pracy, należy korzystać z poniższej tabeli. Jeśli przebieg sekwencjonowania lub przygotowanie biblioteki dla próbek dwukrotnie zakończy się niepowodzeniem, do rozwiązania problemu może być konieczne podjęcie dodatkowych czynności. Skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
Przebieg sekwencjonowania nie spełnia specyfikacji kontroli jakości przebiegu.	- Błąd konsolidacji - Błąd rozcieńczenia - Niekompletna denaturacja cieplna PRL/PDL - Problemy z przygotowaniem materiałów eksploatacyjnych do sekwencjonowania (na przykład nierozmrożone odpowiednio, kondensacja/pozostałości na ogniwie przepływowym)	Powtórzyć sekwencjonowanie bibliotek z płytki PCR zawierającej znormalizowane biblioteki (NL). Patrz Przygotowanie do sekwencjonowania na stronie 78.
	- Nieprawidłowe użycie sond umożliwiających wzbogacanie (na przykład sond OPR1 używanych do próbek DNA, sondy OPD2 używane do próbek RNA) - Błąd w procedurze przygotowania biblioteki w czasie lub po pierwszym etapie hybrydyzacji	Ponownie wzbogacić biblioteki z płytki PCR zawierającej biblioteki próbek po amplifikacji (ALS). Patrz Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji na stronie 60.
	Nie spełniono wymagań dotyczących wyjściowej próbki	Rozpocząć przygotowanie biblioteki od początku procedury. Patrz Denaturacja RNA i przyłączanie starterów na stronie 45 lub Fragmentacja gDNA na stronie 50 .

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
Błąd związany z generowaniem raportu lub ogólny błąd aparatu (np. błąd sieci, błędy ładowania/rozładowywania odczytników itp.)	Błąd w procedurze przygotowania biblioteki w czasie lub przed etapem indeksowania PCR	Ponownie wzbogacić biblioteki z płytki PCR zawierającej biblioteki próbek po amplifikacji (ALS). Patrz Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji na stronie 60 .
	Problem związany z aparatem	Skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.
	Problem związany z oprogramowaniem lub aparatem.	Aby uzyskać pomoc dotyczącą generowania raportów, patrz Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (nr dokumentu: 200008661). Skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina, aby uzyskać dodatkową pomoc.
Biblioteka DNA nie spełnia specyfikacji kontroli jakości.	Nie spełniono wymagań dotyczących poziomu wejściowego próbki.	Zapewnić odpowiedni poziom wejściowy próbki i powtórzyć przygotowanie biblioteki od etapu fragmentacji gDNA. Patrz Wymagania dotyczące próbek na stronie 27 oraz Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28 .

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
	Błąd w procedurze testu związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem.	Powtórzyć przygotowanie biblioteki poczynawszy od jednej z poniższych czynności, w zależności od tego, w którym miejscu wystąpił podejrzewany błąd związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem. Jeśli wystąpił nieznany błąd lub inne błędy, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina, aby rozwiązać problem związany z przebiegiem. • Powtórzyć sekwencjonowanie bibliotek z płytki PCR zawierającej znormalizowane biblioteki (NL). Patrz Przygotowanie do sekwencjonowania na stronie 78. • Ponownie wzbogacić biblioteki z płytki PCR zawierającej biblioteki próbek po amplifikacji (ALS). Patrz Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji na stronie 60. • Rozpocząć przygotowanie biblioteki od początku procedury. Patrz Fragmentacja gDNA na stronie 50.

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
	Nie spełniono kryteriów CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE.	Należy zapoznać się z ostrzeżeniami i środkami ostrożności, aby uzyskać informacje na temat zapobiegania wystąpienia zanieczyszczenia krzyżowego. Należy sprawdzić układ płytki oraz indeksowanie bibliotek, aby upewnić się, że biblioteki z tym samym indeksem nie były sekwencjonowane razem. W przypadku bibliotek, których dotyczy problem, należy rozpocząć przygotowanie biblioteki od początku procedury. Patrz Fragmentacja gDNA na stronie 50. Podczas ekstrakcji próbki mogło dojść do jej zanieczyszczenia. Konieczne może być powtórzenie ekstrakcji, aby upewnić się, że próbka jest wolna od zanieczyszczeń.
	Niepowodzenie użytecznych MSI.	Sprawdzić ustawienia fabryczne homogenizatora ultradźwiękowego dotyczące użytkowania i działania (w tym poziom wody i typ próbki). Zapewnić odpowiedni poziom wejściowy próbki do oznaczenia. Patrz Wymagania dotyczące próbek na stronie 27 oraz Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28. Ekstrakcja nowej próbki i/lub powtórzenie etapu fragmentacji gDNA mogą być konieczne, jeśli próbka jest nadmiernie pofragmentowana lub uszkodzona.

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
	Próbka może być nadmiernie pofragmentowana lub zawarty w niej kwas nukleinowy może być uszkodzony, co wpływa na możliwość wygenerowania wystarczającej liczby unikalnych bibliotek.	Należy zapoznać się z Ustawienia konfiguracji homogenizatora ultradźwiękowego dla fragmentacji DNA na stronie 24 i ustawieniami fabrycznymi homogenizatora ultradźwiękowego dotyczącymi użytkowania i działania (w tym poziom wody i typ próbki). Zapewnić odpowiedni poziom wejściowy próbki do oznaczenia. Patrz Wymagania dotyczące próbek na stronie 27 oraz Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28 . Ekstrakcja nowej próbki i/lub powtórzenie etapu fragmentacji gDNA mogą być konieczne, jeśli próbka jest nadmiernie pofragmentowana lub uszkodzona.
Biblioteka RNA nie spełnia specyfikacji kontroli jakości.	Nie spełniono wymagań dotyczących poziomu wejściowego próbki.	Zapewnić odpowiedni poziom wejściowy próbki i powtórzyć przygotowanie biblioteki od etapu denaturacji RNA i przyłączania starterów. Patrz Wymagania dotyczące próbek na stronie 27 oraz Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28 .

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
	Błąd w procedurze testu związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem.	Powtórzyć przygotowanie biblioteki poczynawszy od jednej z poniższych czynności, w zależności od tego, w którym miejscu wystąpił podejrzewany błąd związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem. Jeśli wystąpił nieznany błąd lub inne błędy, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina, aby rozwiązać problem związany z przebiegiem. • Powtórzyć sekwencjonowanie bibliotek z płytki PCR zawierającej znormalizowane biblioteki (NL). Patrz Przygotowanie do sekwencjonowania na stronie 78. • Ponownie wzbogacić biblioteki z płytki PCR zawierającej biblioteki próbek po amplifikacji (ALS). Patrz Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji na stronie 60. • Rozpocząć przygotowanie biblioteki od początku procedury. Patrz Denaturacja RNA i przyłączanie starterów na stronie 45.
	Próbka może być nadmiernie pofragmentowana lub zawarty w niej kwas nukleinowy może być uszkodzony, co wpływa na możliwość wygenerowania wystarczającej liczby unikalnych bibliotek.	Zapewnić odpowiedni poziom wejściowy próbki. Patrz Wymagania dotyczące próbek na stronie 27 oraz Ekstrakcja, oznaczenie ilościowe i przechowywanie kwasów nukleinowych na stronie 28. Ekstrakcja nowej próbki może być konieczna, jeśli próbka jest nadmiernie pofragmentowana lub uszkodzona.

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
Niepowodzenie kontroli dodatniej (DNA/RNA).	Wymagania dotyczące poziomu wejściowego próbki dla kontroli dodatniej nie zostały spełnione. Błąd w procedurze testu związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem.	Zapewnić odpowiedni poziom wejściowy do oznaczenia. Sprawdzić układ płytki i upewnić się, że w odpowiednich dołkach znajdują się odpowiednie odczynniki (sondy, indeksy). Upewnić się, że próbka kontroli dodatniej jest przechowywana zgodnie z informacjami podanymi na etykiecie. W przypadku próbek, które mają tą samą kontrolę dodatnią należy powtórzyć przygotowanie biblioteki poczynawszy od jednej z poniższych czynności, w zależności od tego, w którym miejscu wystąpił błąd związany ze sposobem użycia lub wyposażeniem. Jeśli wystąpił nieznany błąd lub inne błędy, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina, aby rozwiązać problem związany z przebiegiem. • Powtórzyć sekwencjonowanie bibliotek z płytki PCR zawierającej znormalizowane biblioteki (NL). Patrz Przygotowanie do sekwencjonowania na stronie 78. • Ponownie wzbogacić biblioteki z płytki PCR zawierającej biblioteki próbek po amplifikacji (ALS). Patrz Przygotowanie pierwszej hybrydyzacji na stronie 60. • Rozpocząć przygotowanie biblioteki od początku procedury. Patrz Denaturacja RNA i przyłączanie starterów na stronie 45 lub Fragmentacja gDNA na stronie 50.

Obserwacja	Możliwa przyczyna	Zalecane działanie
Niepowodzenie kontroli NTC (DNA/RNA).	Doszło do zanieczyszczenia krzyżowego lub zanieczyszczenia obszaru roboczego.	Należy zapoznać się z częścią „Ostrzeżenia i środki ostrożności”, aby uzyskać informacje na temat dekontaminacji obszarów roboczych i unikania zanieczyszczenia krzyżowego. Należy sprawdzić układ płytki oraz indeksowanie bibliotek, aby upewnić się, że biblioteki z tym samym indeksem nie były sekwencjonowane razem. Powtórzyć przygotowanie biblioteki od początku procedury dla wszystkich bibliotek, które mają wspólną kontrolę bez matrycy.
	Nieprawidłowe indeksowanie biblioteki.	
Oprogramowanie wskazuje, że w przebiegu sekwencjonowania nie uwzględniono kontroli dodatnich i/lub ujemnych.	Nieprawidłowe przypisanie typu nowotworu podczas planowania przebiegu w Local Run Manager.	Należy pobrać analizę z prawidłowo zidentyfikowanymi elementami kontrolnymi zgodnie z instrukcjami zawartymi w Przewodniku po procedurze modułu analizy (patrz <i>Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module</i> (nr dokumentu: 200008661)).

Charakterystyka wydajności

TSO Comprehensive (EU) jest ukierunkowanym panelem NGS wykrywającym zmiany w 517 genach. Małe warianty DNA – substytucje pojedynczych nukleotydów (SNV), warianty wielonukleotydowe (MNV), insercje i delecje – kwalifikują się do zgłoszenia w wypadku wszystkich 517 genów. Obciążenie mutacyjne guza jest zgłaszane jako wynik oparty na liczbie wariantów somatycznych nieprowadzących do rozwoju nowotworu na milion par zasad (szczegółowe informacje zawiera *Instrukcja wykonywania procedur przy użyciu modułu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module* (nr dokumentu: 200008661)). MSI jest zgłaszane jako status. Amplifikacje genów kwalifikują się do zgłoszenia w wypadku genów MET i ERBB2. Fuzje kwalifikują się do raportowania z 23 genów wskazanych w [Podsumowanie i wyjaśnienie zasady działania testu na stronie 1](#). Warianty splicingowe kwalifikują się do zgłoszenia w wypadku genów MET i EGFR. Zgłaszane są warianty wykryte i poparte świadectwem w bibliotece KB testu TSO Comprehensive (EU) oraz kwalifikujące się na podstawie rodzaju badanej tkanki. Aby zostały zgłoszone, fuzje NTRK wymagają, aby partnerem fuzji był koniec 5', a domena kinazowa NTRK była nienaruszona.

W przypadku małych wariantów DNA zastosowano reprezentatywne podejście do walidacji docelowych genów w panelu z danymi reprezentującymi SNV, MNV, insercje i delecje. W przypadku amplifikacji genów, fuzji i wariantów splicingowych badanie przeprowadzono na poziomie genu. TMB i MSI zostały ocenione zgodnie ze wskazaniami. W przypadku badań diagnostyki uzupełniającej CDx na obecność fuzji genów NTRK fuzje w próbkach FFPE testowano w badaniach skupiających się na określonych parametrach (tj. granicy wykrywalności, precyzji w obrębie laboratorium, odtwarzalności, dokładności i skuteczności klinicznej).

[Tabela 42](#) zawiera definicje metryk obliczanych w różnych badaniach.

Tabela 42 Definicje metryk

Termin	Definicja
Procentowa zgodność wyników dodatnich (PPA)	Odsetek prawidłowo zidentyfikowanych wyników dodatnich spośród wszystkich wyników dodatnich w odniesieniu do metody ortogonalnej.
Procentowa zgodność wyników ujemnych (NPA)	Odsetek prawidłowo zidentyfikowanych wyników ujemnych spośród wszystkich wyników ujemnych w odniesieniu do metody ortogonalnej.
Całkowity odsetek zgodności (OPA)	Odsetek prawidłowo zidentyfikowanych wyników dodatnich i ujemnych spośród wszystkich obserwacji w odniesieniu do metody ortogonalnej.
Procent rozpoznań dodatnich (PPC)	Odsetek obserwacji, które są dodatnie dla celu spośród obserwacji przewidywanych jako dodatnie dla celu.
Procent rozpoznań ujemnych (PNC)	Odsetek obserwacji, które są ujemne dla celu spośród obserwacji przewidywanych jako ujemne dla celu.
n/N	Liczba obserwacji dodatnich lub ujemnych (n) podzielona przez całkowitą liczbę obserwacji (N) w celu obliczenia odpowiednio PPC lub PNC. Wartości n i N mogą być na różnych poziomach (np. wariant lub gen) lub łączone w grupie (np. SNV).
Odchylenie standardowe (SD)	Miara wielkości odchylenia wartości zmiennej od jej średniej.
Względny współczynnik zmienności (%CV)	Odchylenie standardowe podzielone przez średnią jako wartość procentowa.

Zanieczyszczenie krzyżowe

Przeprowadzono badanie zanieczyszczenia krzyżowego mające na celu stwierdzenie, czy wyniki fałszywie dodatnie powstały na skutek przeniesienia zanieczyszczenia z sąsiedniego dołka na etapie przygotowania biblioteki lub przeniesienia zanieczyszczenia między kolejnymi seriami. Analizę tę przeprowadzono dla małych wariantów DNA (które również wpływają na TMB), fuzji, amplifikacji genów i MSI. Na bazie scharakteryzowanych próbek przygotowano biblioteki w układzie szachownicy z naprzemiennie ułożonymi próbkami w celu oceny zanieczyszczenia z sąsiedniego dołka oraz z naprzemiennymi indeksami do oceny zanieczyszczenia krzyżowego pomiędzy seriami sekwencjonowania w przypadku sekwencjonowania kolejno za pomocą tego samego Aparatu NextSeq 550Dx. Badanie dotyczące zanieczyszczenia krzyżowego wykazało brak zdarzeń zanieczyszczenia w przypadku badania wykrytych wariantów w każdej próbce, bez wykrycia wyników fałszywie dodatnich.

Dwie metryki kontroli jakości (CONTAMINATION_SCORE i P_VALUE) zostały zaprojektowane do testu TSO Comprehensive (EU) w celu wykrywania zanieczyszczenia próbek w próbkach DNA. Oceniono czułość wykrywania zanieczyszczeń. Próbkę DNA guza FFPE mieszano z różnymi ilościami próbek prawidłowego DNA FFPE w celu utworzenia celowo skażonych próbek.

Łącznie wygenerowano 1112 obserwacji zanieczyszczeń, a zanieczyszczenie wykryto w 95% (1054) obserwacji. Częstość wykrywania wzrosła do 96% (939/976), gdy odsetek zanieczyszczeń wynosił od 10% do 90% (masa/masa). Spośród 37 obserwacji od 10% do 90%, gdzie nie wykryto zanieczyszczenia, 12 nie spełniło specyfikacji pokrycia w celu rozpoznania małych wariantów DNA. Niskie pokrycie utrudniło wykrywanie zanieczyszczeń, ale nie zgłoszono małych wariantów DNA, co złagodziło skutki zanieczyszczenia. Piętnaście obserwacji nie spełniło specyfikacji amplifikacji genów (metryka kontroli jakości mediany liczby przedziałów) w celu rozpoznania amplifikacji genów. Nie zgłoszono żadnego wyniku amplifikacji genów dla próbek.

Oczekuje się, że w teście TSO Comprehensive (EU) będzie występowało niewielkie zanieczyszczenie krzyżowe pomiędzy dołkami lub seriami. Wyniki te wraz z metrykami zanieczyszczeń w oprogramowaniu zmniejszają ryzyko fałszywych wyników wariantów z powodu zanieczyszczenia próbek.

Ocena zestawów do ekstrakcji kwasów nukleinowych

Trzy dostępne w handlu zestawy do ekstrakcji DNA i RNA oceniano za pomocą testu TSO Comprehensive (EU). Za pomocą tych trzech zestawów do ekstrakcji izolowano zarówno DNA, jak i RNA z tych samych skrawków tkanki FFPE. Zestawy różniły się czynnikami do deparafinizacji oraz na etapie wiązania kwasów nukleinowych (Tabela 43). Zestaw 1 był głównym zestawem ekstrakcyjnym używanym do ustalenia działania testu TSO Comprehensive (EU).

Tabela 43 Charakterystyka zestawu

Zestaw	Środek do deparafinizacji	Wiązanie kwasu nukleinowego
1	Zastrzeżony	Kolumna
2	Ksylen	Kolumna
3	Olej mineralny	Kulki magnetyczne

W Tabeli 44 i Tabeli 45 podsumowano wpływ zestawów ekstrakcyjnych na ważność biblioteki i rozpoznawanie wariantów. Jeśli średnie dla zestawów ekstrakcyjnych były istotnie różne, zgłaszano tę różnicę. Średnie różnice między zestawami ekstrakcyjnymi obliczono przy użyciu Zestawu 1 jako kontrolę, ponieważ Zestaw 1 został użyty do ekstrakcji większości kwasów nukleinowych używanych w badaniach analitycznych TSO Comprehensive (EU). Zgłoszono średnią różnicę względem Zestawu 1, aby zilustrować, w jaki sposób różne zestawy ekstrakcyjne wpłyną na inne badania analityczne TSO Comprehensive (EU).

Tabela 44 Wpływ zestawu ekstrakcyjnego na ważność bibliotek

Rodzaj wariantu	Metryka kontroli jakości biblioteki RNA	Średnia różnica względem Zestawu 1
Małe warianty DNA/TMB	Mediana pokrycia eksonów (liczba)	Zestaw 2 niższy o 56 odczytów
	PCT Exon 50X (%)	Zestaw 3 wyższy o 0,298%
	Mediana rozmiaru insertu (bp)	Zestaw 2 i Zestaw 3 niższe o 3 bp
DNA MSI	Użyteczne miejsca MSI	Zestaw 3 wyższy o 8 miejsc
Amplifikacje genów DNA	COVERAGE_MAD (liczba)	Zestaw 2 niższy o 0,0043
	Mediana liczby przedziałów	Zestaw 2 niższy o 0,5825, Zestaw 3 wyższy o 0,3086
RNA (fuzje / warianty splicingowe)	Mediana rozmiaru insertu (bp)	Zestaw 3 wyższy o 2 bp
	Dziennik (CV mediany Gene500X)	Zestaw 2 wyższy o 0,029
	Suma w odczytach docelowych	Brak istotnej różnicy

Zaobserwowano, że Zestawy ekstrakcyjne 2 i 3 mają zwiększone odczyty potwierdzające, dzięki czemu fuzje i warianty splicingowe w pobliżu LoD charakteryzuje większe prawdopodobieństwo wykrycia z powodu wyboru zestawów ekstrakcyjnych.

Tabela 45 Wpływ zestawu ekstrakcyjnego na rozpoznawanie wariantów

Typ wariantu (jednostki)	Rozpoznawanie wariantu (średnia różnica względem Zestawu 1)
Małe warianty DNA (VAF)	Nieistotne technicznie Warianty docelowe: wariancja pomiędzy zestawami była niewielka względem pozostałości Warianty niedocelowe: Brak istotnych różnic dla pierwszych dwóch przedziałów VAF. Brak znaczących różnic w przypadku zaobserwowania istotności statystycznej.
TMB (mutacje na milion par zasad)	Nieistotna technicznie wariancja pomiędzy zestawami była niewielka względem pozostałości
MSI (% niestabilnych miejsc)	Zestaw 3 niższy o 1,9% niestabilnych miejsc
Amplifikacja genów (krotność zmiany)	Zestaw 2 (0,06) i Zestaw 3 (0,08) – wyższa krotność zmiany

Typ wariantu (jednostki)	Rozpoznawanie wariantu (średnia różnica względem Zestawu 1)
Fuzje (odczyty potwierdzające)	Zestaw 2 zawierał 51%, a Zestaw 3 wykazał 23% wzrost w odczytach potwierdzających
Warianty splicingowe (odczyty potwierdzające)	W Zestawach 2 i 3 odnotowano 48% wzrost w odczytach potwierdzających

Substancje zakłócające

Oceniono wpływ potencjalnych substancji endogennych i egzogennych na wydajność testu TSO Comprehensive (EU). Substancje endogenne (melanina i hemoglobina), zostały dodane do próbek podczas procesu ekstrakcji kwasu nukleinowego. Substancje egzogenne (etanol, ksylen i proteinaza K) były obecne podczas procesu ekstrakcji kwasów nukleinowych; dodano je także do oczyszczonego kwasu nukleinowego przed przygotowaniem biblioteki. W przypadku zauważenia wpływu na dodaną proteinazę K oceniano również zwiększone stężenia proteinazy K podczas procesu ekstrakcji. Podczas przygotowywania biblioteki dodano nadmiar starterów indeksu (15% i 30%). Oprócz starterów indeksujących do próbek FFPE pobranych z tkanki mózgowia, piersi, jelita grubego, płuca, raka rdzeniastego tarczycy, NDRP, raka jajnika, prostaty, śliny, skóry, tkanki miękkiej i tkanki tarczycy dodano substancje – ekstrahowano osiem próbek do analizy DNA i 13 do analizy RNA. W przypadku starterów indeksujących do analizy DNA użyto sześciu próbek FFPE z trzech różnych typów tkanek (tarczycy, pęcherza moczowego, okrężnicy), a do analizy RNA wykorzystano pięć próbek FFPE z czterech różnych typów tkanek (płuca, tarczycy, okrężnicy, piersi). Dla każdej z 16 unikalnych próbek przeprowadzono kontrolę endogenną bez dodatków oraz kontrolę egzogenną buforową lub z dodatkiem wody. Wpływ martwicy oceniono, używając innego zestawu ośmiu próbek FFPE tkanki mózgowia, jelita grubego i płuca. Dla każdej próbki martwiczey istniała poddana makrodysekcji próbka kontrolna bez martwicy. W przypadku wszystkich czynników zakłócających cztery powtórzenia dla próbki i substancji zbadano za pomocą testu TSO Comprehensive (EU) i porównano z odpowiednim stanem kontrolnym w celu wykrycia małych wariantów DNA, amplifikacji genów, fuzji RNA i wariantów splicingowych RNA, a także ustalenia MSI i wskaźnika TMB. Uwzględniono zarówno warianty profilujące CDx, jak i nowotwór.

Wykrywanie wariantów DNA

Melanina (0,2 µg/ml), hemoglobina (2 mg/ml), etanol (5%), proteinaza K (0,04 mg/ml w kwasie nukleinowym) i ksylen (0,0001%) nie wpływają na wynik TMB, status MSI, małe warianty DNA ani amplifikacje genów.

Wykrywanie wariantów RNA

Dane potwierdzają brak wpływu melaniny (0,2 µg/ml), etanolu (5%) i ksylenu (0,0001%) na wykrywalność fuzji RNA lub wariantów splicingowych. Hemoglobina (2 mg/ml) wpływała (zmniejszała liczbę odczytów potwierdzających) na trzy różne warianty splicingowe w genie MET. Nie wpłynęła na wariant splicingowy

w genie AR (trzy różne próbki) i jeden w genie EGFR (jedna próbka). Jeśli w laboratorium przeprowadza się test RNA, należy unikać lub minimalizować ilość tkanki z hemoglobina podczas uzyskiwania wycinków z bloku tkankowego.

Proteinaza K (0,04 mg/ml w kwasie nukleinowym) wpływała na fuzje RNA i warianty splicingowe. Proteinazę K badano w dawce 2,6 mg/ml i 5,2 mg/ml podczas procesu ekstrakcji, co stanowi 2- i 4-krotne stężenie standardowe w dostępnym na rynku zestawie. Fuzje hamowano przy 4-krotności, ale nie przy 2-krotności ilości proteinazy K. Warianty splicingowe hamowano przy 2-krotności proteinazy K. Ilości proteinazy K lub enzymu równoważnego nie należy zwiększać podczas ekstrakcji ze standardowego stężenia podanego w zestawie do ekstrakcji.

Odczyty potwierdzające dla wariantów splicingowych zmniejszają się przy 30% nadmiarze starterów indeksujących, ale nie przy 15% nadmiarze.

Martwica

Obecność do 70% tkanki martwicznej nie wpływała na wynik TMB, status MSI ani na małe warianty DNA. Warianty RNA (odczyty potwierdzające) i wykrywanie amplifikacji genów (krotności zmiany) zostały odpowiednio zmniejszone w próbkach z $\geq 25\%$ i $\geq 23\%$ (według obszaru) zawartości martwicznej w obszarze tkanki. Jeśli wycinek próbki zawiera $\geq 23\%$ martwicy w całkowitej powierzchni tkanki, wówczas tkankę martwiczą należy poddać makrodysekcji.

Stabilność

Stabilność w czasie rzeczywistym

Stabilność w czasie rzeczywistym została wykorzystana do ustalenia okresu trwałości zestawu testu TSO Comprehensive (EU) podczas przechowywania w warunkach podanych na etykiecie. Schemat badania opierał się na testowaniu trzech partii odczynników i wykorzystano klasyczny schemat badania stabilności opisany w dokumencie CLSI EP25-A. Zestawy były przechowywane w ostatecznej konfiguracji zestawu przez czas trwania badania w warunkach przechowywania określonych na etykiecie produktu. Zamrożone elementy zestawu były przechowywane w temperaturze od -15°C do -25°C . Schłodzone elementy zestawu przechowywano w temperaturze od 2°C do 8°C .

Zestawy testowano pod kątem wyglądu i funkcjonalnych kryteriów zwolnienia zestawu w określonych punktach czasowych. Dodatkowo dla materiału kontrolnego do kontroli jakości analizowano rozpoznawanie wariantów i trendy parametrów kontroli jakości próbki. Dla każdego odczynnika ustalono okres trwałości. Terminy ważności są przypisywane w oparciu o datę produkcji i okres trwałości. Termin ważności zestawu jest ustalany w oparciu o odczynnik, którego termin ważności upływa najwcześniej.

Stabilność zestawu podczas użytkowania

Stabilność zestawu testu TSO Comprehensive (EU) podczas użytkowania została oceniona w standardowych warunkach użytkowania przez cały okres przechowywania, aby potwierdzić możliwość wielokrotnego użycia zestawu. Zestaw odczynników został poddany wielokrotnemu zamrażaniu/rozmarzaniu i został przetestowany,

aby potwierdzić możliwość maksymalnie 4 zastosowań zestawu. Ponadto w sumie 3-krotnie przygotowano 8 bibliotek RNA i 8 bibliotek DNA, aby przetestować maksymalną liczbę obsługiwanych bibliotek (24 biblioteki DNA i 24 biblioteki RNA na zestaw). Wszystkie funkcjonalne kryteria zwolnienia zestawu zostały spełnione dla wszystkich testowanych cykli zamrażania-rozmrażania i punktów czasowych. Przeprowadzono testy próbek FFPE z odczynnikami mającymi ≥ 25 miesięcy, aby ocenić wpływ testowania w trakcie użytkowania na rozpoznawanie wariantów. Jakościowa analiza wariantów docelowych wykazała, że zdarzenia w trakcie użytkowania nie miały wpływu na rozpoznawanie wariantów.

Stabilność kwasu nukleinowego

Stabilność kwasów nukleinowych (DNA i RNA) i powiązane z nimi oznaczenia ilościowe do stosowania z testem TSO Comprehensive (EU) oceniano przy użyciu próbek FFPE z wielu typów tkanek. Bloczki FFPE przecięto na części i wszystkie kwasy nukleinowe zostały wyekstrahowane jednocześnie. Wyekstrahowany kwas nukleinowy został dokładnie wymieszany, poddany kwantyfikacji, sprawdzony pod kątem jakości kwasu nukleinowego i podzielony pomiędzy dwa zestawy jednorazowych probówek do zamrożenia dla dwóch punktów czasowych: kontrola T0 (punkt wyjściowy) i badanie T1 (≥ 28 dni). Cały wyekstrahowany kwas RNA przechowywano w temperaturze od -85°C do -65°C i cały wyodrębniony kwas DNA przechowywano w temperaturze od -25°C do -15°C przez wskazane okresy czasu, a następnie przetwarzano je w teście TSO Comprehensive (EU) z wieloma powtórzeniami i operatorami. Stan testu T1 porównano z kontrolą statusu MSI, wyniku TMB, amplifikacji genów, małych wariantów DNA, fuzji RNA i wariantów splicingowych RNA. Dane wskazują, że kwasy nukleinowe i powiązane z nimi oznaczenia ilościowe do stosowania z testem TSO Comprehensive (EU) są stabilne przez okres do 28 dni w przypadku przechowywania w zalecanych temperaturach (RNA w temperaturze od -85°C do -65°C i DNA w temperaturze od -25°C do -15°C).

Stabilność biblioteki

Stabilność bibliotek wykorzystujących każdy z sześciu bezpiecznych punktów zatrzymania dla testu (patrz [Tabela 5](#)) oceniono przy użyciu próbek FFPE z wielu typów tkanek. Biblioteki kontrolne (T0, bez punktów zatrzymania) były sekwencjonowane natychmiast po zakończeniu przepływu pracy. Podpróbki z tych samych bibliotek przechowywano w punktach zatrzymania w temperaturze od -25°C do -15°C przez czas (T1), aby uwzględnić dni wymienione w [Tabela 5](#). T1 porównano z T0 dla małych wariantów DNA, TMB, amplifikacji genów, MSI, fuzji RNA i wariantów splicingu RNA z wariantami CDx i profilowania guza. Dane wskazują, że biblioteki wygenerowane z oznaczenia TSO Comprehensive (EU) są stabilne zgodnie z instrukcją użytkowania.

Stabilność tkanki FFPE na szkiełku

Stabilność tkanek FFPE na szkiełku dla potrzeb testu TSO Comprehensive (EU) oceniano poprzez przecięcie bloczków FFPE (skrawki $5\text{ }\mu\text{m}$) pochodzących z różnych unikalnych próbek, umieszczonych na szkiełkach, a następnie przechowywanych w temperaturze pokojowej (22°C) dla 2 punktów czasowych. RNA ekstrahowano i przechowywano w temperaturze od -65°C do -85°C , a DNA ekstrahowano i przechowywano w temperaturze od -15°C do -25°C przez mniej niż 1 tydzień przed badaniem. Materiał kwasu nukleinowego oznaczano ilościowo, a następnie przetwarzano w teście TSO Comprehensive (EU) w ciągu 24 godzin dla każdego punktu czasowego. W każdym punkcie czasowym badano wiele powtórzeń i operatorów na próbkę

w teście TSO Comprehensive (EU) i porównywano je z punktem czasowym T0 w zakresie MSI, TMB, amplifikacji genów, małych wariantów DNA, fuzji RNA i wariantów splicingowych RNA, w tym wariantów CDx i profilujących nowotwór. Analiza wariantów została oceniona i spełniała wszystkie kryteria akceptacji, wskazując, że tkanki FFPE umieszczone na szkiełkach do stosowania z testem TSO Comprehensive (EU) są stabilne w temperaturze pokojowej przez okres do 4 tygodni (28 dni). Należy zauważyć, że po 4 tygodniach (28 dniach) wykryto 10% spadek wskaźnika ważności biblioteki MSI w zakresie kontroli jakości ze względu na połączenie czasu pracy operatora i przechowywania. Fuzja RNA i warianty splicingu miały około 29% spadek w zakresie uzupełniających odczytów po przechowywaniu na szkiełkach przez 4 tygodnie (28 dni).

Pasmo ochronne miareczkowania wejściowej ilości kwasu nukleinowego

Wejściową ilość kwasu nukleinowego w teście TSO Comprehensive (EU) oceniano poprzez zbadanie DNA z 33 próbek FFPE obejmujących 17 typów tkanek, przy ilości wejściowej od 10 ng do 500 ng, oraz poprzez zbadanie RNA z 5 próbek FFPE z 5 typów tkanek przy ilości wejściowej w zakresie od 10 ng do 85 ng. Przeprowadzono ocenę metryk kontroli jakości biblioteki i były one zależne od próbki. Wyniki badania DNA wykazały, że niektóre, ale nie wszystkie metryki kontroli jakości próbki DNA reagują na ilość wejściową powyżej nominalnej wartości wynoszącej 40 ng:

- Metryka MEDIAN_INSERT_SIZE nie reagowała na ilość wejściową powyżej 30 ng.
- Metryka MEDIAN_EXON_COVERAGE wykazywała dodatnią korelację z rosnącą ilością wejściową.
- Metryka PCT_EXON_50X wzrastała wraz z rosnącą ilością wejściową aż do 80 ng.
- Metryka USABLE_MSI_SITES wzrastała wraz z rosnącą ilością wejściową. Niektóre próbki, dla których przy 40 ng metryka USABLE_MSI_SITES wykazywała wartość niższą niż 40, spełniały specyfikację przy wyższych wartościach ilości wejściowej, co umożliwiłoby obliczenie wyniku MSI.
- Metryka MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET wzrastała z rosnącą ilością wejściową.
- Zwiększanie ilości wejściowej powoduje wzrost metryki COVERAGE_MAD w kierunku górnej granicy specyfikacji.

Metryki kontroli jakości próbki RNA wzrastały (MEDIAN_INSERT_SIZE i TOTAL_ON_TARGET_READS) lub malały (MEDIAN_CV_GENE_500X) w zakresie od 10 ng do 40 ng, ale ogólnie nie zmieniały się dla ilości wejściowej leżącej pomiędzy 40 ng a 85 ng.

Granica próby ślepej

Odsetek wyników fałszywie dodatnich (z całkowitej liczby oczekiwanych wyników ujemnych) oceniano poprzez wielokrotne badanie prawidłowej lub łagodnie zmienionej sąsiadującej tkanki FFPE, która nie powinna zawierać wariantów somatycznych dla małych wariantów DNA, amplifikacji genów, MSI, fuzji RNA i wariantów splicingowych RNA. Fałszywie dodatnie wyniki nie zostały przeanalizowane pod kątem TMB, ponieważ nie ma klinicznych wartości granicznych. Sześć próbek DNA i 6 próbek RNA typu FFPE zostało przebadanych w dwóch powtórzeniach przez 2 operatorów w ciągu 3 dni dla każdej z 2 serii odczytników. Podzbiór próbek został

ponownie spulowany i ponownie zsekwencjonowany w formacie tylko 3× DNA i tylko 3× RNA, aby ocenić procent wyników fałszywie dodatnich z użyciem kilku konfiguracji multipleksowych obsługiwanych przez to urządzenie. Ponadto 30 dodatkowych próbek RNA poddano analizie w dwóch powtórzeniach, które zostały przetworzone przy użyciu 1 partii odczynników po podzieleniu pomiędzy 2 operatorów. Łącznie było to 168 możliwych obserwacji dla DNA i 228 obserwacji dla RNA, które to liczby pomniejszono przez nieważne biblioteki dla każdego typu wariantu. Procent wyników fałszywie dodatnich obliczono na poziomie genu dla amplifikacji i na poziomie pozycji (około 1,9 miliona pozycji) dla małych wariantów DNA. Odsetek wyników fałszywie dodatnich dla typów wariantów DNA przedstawiono w [Tabela 46](#). TSO Comprehensive (EU) nie ma deklaracji CDx (poziom 1) dla małych wariantów DNA, więc nie można zgłaszać małych wariantów fałszywie dodatnich DNA dla poziomu 1. 271 wyników fałszywie dodatnich zostało zniwelowanych przez bazę wiedzy TSO Comprehensive (EU). Nie stwierdzono klinicznie istotnych wyników fałszywie dodatnich (poziom 2). Na poziomie 3 stwierdzono 4 wyniki fałszywie dodatnie wynikające z 2 wariantów w 4 (2,4%) obserwacjach ze 168 obserwacji. Odsetek wyników fałszywie dodatnich dla wariantów fuzji RNA i wariantów splicingowych wynosił 0%, jak pokazano w [Tabela 47](#).

Tabela 46 Fałszywie dodatnie w podziale na rodzaje wariantów DNA

Rodzaj wariantu	Fałszywie dodatnie
Amplifikacje genów	0% (0/9912)
Małe warianty DNA	0,0001% (271/295 801 567)
MSI	0% (0/156)
TMB	nd.*

* Fałszywie dodatnie wyniki nie mają tu sensu, ponieważ TMB jest zgłaszane jako wskaźnik i nie daje wyniku jakościowego.

Tabela 47 Odsetek wyników fałszywie dodatnich w podziale na rodzaje wariantów RNA

Rodzaj wariantu	Fałszywie dodatnie
Fuzja	0% (0/227)
Wariant splicingowy	0% (0/227)

Granica wykrywalności

Przeprowadzono dwa badania w celu oceny granic wykrywalności dla testu TSO Comprehensive (EU). W badaniu 1 oceniano małe warianty RET DNA, fuzje RET i fuzje NTRK1–3. W badaniu 2 oceniano inne warianty profilujące nowotwór.

Badanie 1

Określono granice wykrywalności (LoD) małych wariantów DNA genów NTRK1, NTRK3 i RET oraz fuzji genów NTRK1–3 i RET. LoD to najniższa wartość analitu (np. częstość allelu wariantowego lub odczyty potwierdzające), którą można wykryć w sposób powtarzalny (95% granica wykrywalności lub błąd typu II wynoszący 5%). W badaniu użyto tkanki FFPE z małymi wariantami DNA RET (rak rdzeniasty tarczycy), fuzjami RET (rak brodawkowaty tarczycy, atypowy guz Spitz) i fuzjami NTRK1–3 (glejak niskiego stopnia zezłośliwienia, glejak wielopostaciowy, mięsak miofibroblastyczny, mięsak, wydzielniczy rak sutka, rak jelita grubego), jak również preparatu linii komórkowej w formie FFPE z małymi wariantami DNA genów NTRK1 i NTRK3. Każdą próbkę rozcieńczono do co najmniej 5 poziomów testowych (w zakresie od mniej więcej od 0,01 do 0,10 VAF dla małych wariantów DNA i 2–25 odczytów potwierdzających dla fuzji). Dla każdego poziomu testowego na partię i wariant uzyskano 18 obserwacji, które zostały wygenerowane przez 3 operatorów przy pomocy 3 aparatów do sekwencjonowania inicjujących przygotowanie biblioteki w 3 nienastępujących po sobie dniach z 2 powtórzeniami dla każdego poziomu testowego próbki. Przetestowane dwie partie odczynników.

W przypadku wariantów DNA 2 partie analizowano niezależnie, stosując regresję probitową lub podejście z użyciem wskaźnika trafień (najniższy poziom testowy ze wskaźnikiem trafień (estymator punktowy) $\geq 95\%$), aby określić LoD dla każdego wariantu według partii. Jako granicę wykrywalności wariantu przyjęto większą wartość LoD spośród dwóch partii odczynników ([Tabela 48](#)).

W przypadku fuzji RNA linie komórkowe FFPE wykorzystano do oszacowania wartości LoD dla każdego genu fuzyjnego. Wartości LoD zweryfikowano następnie, stosując tkanki FFPE, przy użyciu zduplikowanych bibliotek przygotowanych przez 3 operatorów z użyciem 3 aparatów i 3 serii odczynników, co wygenerowało 54 obserwacje na wariant w pobliżu LoD ustalonej za pomocą linii komórkowych FFPE. Podane granice wykrywalności dla każdej fuzji ([Tabela 49](#)) to najniższe średnie odczyty potwierdzające, które osiągnęły wskaźnik trafień (estymator punktowy) $\geq 95\%$.

Tabela 48 Granica wykrywalności dla małych wariantów DNA genów NTRK1, NTRK3 i RET

Marker	Chr ¹	Pozycja	Odniesienie	Alternatywa	Granica wykrywalności (częstość allelu wariantowego)
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

Marker	Chr ¹	Pozycja	Odniesienie	Alternatywa	Granica wykrywalności (częstość allelu wariantowego)
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (delecja) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = chromosom

² Te warianty DNA analizowano metodą regresji probitowej; pozostałe warianty DNA analizowano, stosując podejście wykorzystujące wskaźnik trafień.

Tabela 49 Granica wykrywalności fuzji NTRK i RET

Gen	Fuzja	Granica wykrywalności (odczyty potwierdzające)
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

Badanie 2

Ocenie poddano granice wykrywalności (LoD) wariantów profilujących nowotwór zgłoszonych przez test TSO Comprehensive (EU). LoD to najniższa wartość analitu (częstotliwość allelu wariantu, krotność zmiany lub odczyty potwierdzające), którą można wykryć w sposób powtarzalny (95% wskaźnik trafień lub błąd typu II wynoszący 5%). Próbkę FFPE z 17 typów tkanek zawierających warianty rozcieńczono do wielu poziomów testowych. Dla każdego poziomu wygenerowano sześć obserwacji dzięki dwóm operatorom z których każdy korzystał z innej partii odczynnika oraz innego aparatu.

Warianty DNA

LoD dla 10 klas małych wariantów DNA (łącznie 25 wariantów) i 2 amplifikacji genów DNA (ERBB2 i MET) określono i podsumowano jako zakresy ([Tabela 50](#)). Uwzględniono również warianty RET, dla których LoD ustalono w badaniu 1. Dla dwóch z 3 insercji powyżej 5 par zasad stwierdzono LoD wynoszącą 0,034 i 0,036 VAF, a dla trzeciej LoD wynosiła 0,215 VAF. Ta ostatnia stanowiła insercję w regionie o niskiej złożoności, gdzie insercja dodaje dodatkowe powtórzenia, wpływa na dopasowanie i wymaga większej liczby odczytów w celu spójnej detekcji. Dlatego niektóre konteksty genomowe o niskiej złożoności mogą wpływać na wykrywanie insercji >5 bp.

Tabela 50 Granica wykrywalności dla małych wariantów DNA i amplifikacji genów

Rodzaj (jednostka miary LoD)	Klasa wariantu / Kontekst genomowy	Liczba wariantów	Zakres (VAF)
Małe warianty DNA (częstotliwość allelu wariantowego)	SNV	5	0,016–0,064
	MNV	3	0,022–0,048
	Insercja (1–2 bp) w pobliżu powtórzeń homopolimerowych	2	0,086–0,104
	Insercja (1–2 bp) w pobliżu powtórzeń dwunukleotydowych	2	0,038–0,051
	Insercja (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Insercja (> 5 bp i do 25 bp)	3	0,034–0,215
	Delecja (1–2 bp) w pobliżu powtórzeń homopolimerowych	2	0,094–0,100
	Delecja (1–2 bp) w pobliżu powtórzeń dwunukleotydowych	2	0,033–0,070
	Delecja (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Delecja (> 5 i do 25 bp)	2	0,047–0,055
Amplifikacje genów (krotność zmiany)	W podziale na geny (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analizę wariantów nieukierunkowanych przeprowadzono z próbek z Badania 1, które miały co najmniej pięć poziomów testowych. Każdy wariant nieukierunkowany analizowano indywidualnie, a LoD szacowano tylko dla wariantów z co najmniej jednym poziomem >0% i ≤95% wskaźnika trafień i co najmniej jednym poziomem ≥95% wskaźnika trafień. [Tabela 51](#) przedstawia percentyle wraz z minimalnymi i maksymalnymi wartościami LoD obserwowanymi według klasy dla wariantów nieukierunkowanych. Warianty nieukierunkowane dostarczają więcej wariantów według klasy niż testowano w Badaniu 2 i są zgodne z zakresami LoD z [Tabela 50](#).

Tabela 51 Podsumowanie statystyk dotyczących granic wykrywalności według klasy wariantów nieukierunkowanych (z Badania 1)

Klasa	N	Min.	25%	50%	75%	90%	Maks.
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
Insercja	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Delecja	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Fuzje

LoD określono dla 19 fuzji odpowiadających 20 genom w panelu TSO Comprehensive (EU), które mieściły się w zakresie od 9 do 31,3 odczytów potwierdzających ([Tabela 52](#)). Dodatkowe 3 geny (NTRK1–3) testowano w innym badaniu. Gen RET testowano tutaj i w innym badaniu. Szesnaście fuzji z ustalonymi LoD miało dane zgodne ze wspólną LoD z 16 odczytów potwierdzających przy użyciu dwustronnego przedziału ufności o górnej granicy (UCL) wynoszącej 95%. Dwie fuzje miały LoD wynoszące 24,7 i 31,3 odczytu potwierdzającego, które nie były zgodne ze wspólną LoD.

Fuzja FGFR2-SRPK2 o wartości LoD 24,7 odczytów potwierdzających miała powtarzające się regiony nakładające się w punkcie pęknięcia, jak zaznaczono w oprogramowaniu testowym TSO Comprehensive (EU). Regiony powtórzeń w obrębie punktu pęknięcia charakteryzują się zazwyczaj niższym poziomem dowodów, ponieważ odczyty mogą mapować inne miejsce w genomie lub mogą pozostać niedopasowane. Dodatkowo regiony powtórzeń sprawiają, że proces składania (wykorzystywany w identyfikacji sekwencji fuzyjnych) jest trudniejszy i wymaga dodatkowych świadectw w celu odtworzenia prawidłowej sekwencji. SEPT14-EGFR to kolejny przykład fuzji z sekwencją homologiczną w punkcie pęknięcia.

Fuzja BCL2-IGHJ5 o wartości LoD wynoszącej 31,3 odczytu potwierdzającego miała bardzo krótki gen (IGHJ5) z punktem pęknięcia w pobliżu początku eksonu, co wymagało krótkich, nieciągłych dopasowań. W konsekwencji dla spójnej detekcji potrzeba było więcej odczytów.

Tabela 52 Granica wykrywalności fuzji

Fuzja	Punkt pęknięcia w genie A	Punkt pęknięcia w genie B	LoD	Wspólna LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	tak
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	tak
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	tak
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	tak
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	tak
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	tak
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	tak

Fuzja	Punkt pęknięcia w genie A	Punkt pęknięcia w genie B	LoD	Wspólna LoD
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	tak
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	tak
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	tak
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nie
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	tak
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	tak
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	tak
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	tak
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	tak
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	tak
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	nie
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	tak

Warianty splicingowe

Dla dwóch wariantów splicingowych RNA MET i EGFR określono LoD na poziomach odpowiednio 18,7 i 16,7 w odczytach potwierdzających.

Odsetek komórek nowotworowych

Wyniki badania stanowią podstawę zaleceń dotyczących odsetka komórek nowotworowych w próbkach klinicznych. Zasadniczo im wyższy odsetek komórek nowotworowych, tym wyższy „sygnał” (VAF, krotność zmiany lub odczyty potwierdzające) wariantów dla nowotworu. Zalecenia dotyczące minimalnego odsetka komórek nowotworowych są oparte na poniższych obserwacjach. Wartości LoD dla małych wariantów DNA są nie większe niż 0,104 VAF (z wyjątkiem insercji TP53). Aby wykryć mutacje kierujące w guzie (częstość alleli wariantowych 0,50), zaleca się, aby odsetek komórek nowotworowych wynosił 20%, dzięki czemu te mutacje będą miały 0,10 VAF i będą na poziomie LoD lub powyżej LoD. Przy odsetku komórek nowotworowych na poziomie 20% geny amplifikowane do poziomu zmienionego 5,5-krotnie (11 kopii) byłyby konsekwentnie wykrywane przy granicy wykrywalności na poziomie 1,8-krotnej zmiany. Przy odsetku komórek nowotworowych na poziomie 20% fuzje z 74 odczytami potwierdzającymi byłyby konsekwentnie wykrywane przy granicy wykrywalności na poziomie 14,7 odczytów potwierdzających.

Odtwarzalność

Przeprowadzono dwa badania w celu oceny odtwarzalności testu TSO Comprehensive (EU). W badaniu 1 oceniano małe warianty DNA genu RET oprócz wariantów fuzji genów NTRK i RET. W badaniu 2 oceniano dodatkowe warianty profilujące nowotwór.

Badanie 1

Badanie to przeprowadzono, aby ocenić odtwarzalność testu TSO Comprehensive (EU) w 3 ośrodkach badawczych (1 wewnętrzny, 2 zewnętrzne) z 2 operatorami na ośrodek, 2 powtórzeniami w ramach przebiegu i w 3 niekolejnych dniach testowania. Testowanie przeprowadzono z użyciem panelu odtwarzalności zawierającego próbki DNA z określonymi znanymi małymi wariantami DNA genu RET oraz próbkami RNA zawierającymi określone znane warianty fuzji genów NTRK1–3 i RET z próbek tkanek i linii komórkowych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (FFPE). Panel zawierał próbki panelu DNA i RNA o niskim poziomie wariantów i wysokim poziomie wariantów, z taką samą liczbą próbek panelu o niskim i wysokim poziomie dla każdej klasy wariantów. Próbki panelu o poziomie wysokim dobierano na mniej więcej 2- do 3-krotność LoD, a próbki panelu o poziomie niskim dobierano na poziomie odpowiadającym mniej więcej LoD. W każdym ośrodku każdy operator testował próbki panelu w duplikatach w 3 powtórzeniach, generując 6 obserwacji na sekwencję docelową na próbkę panelu. Ze wszystkich 3 ośrodków wygenerowano 36 obserwacji dla każdej próbki panelu (3 ośrodki/aparaty × 2 operatorów × 2 powtórzenia w obrębie przebiegu × 3 dni rozpoczęcia).

Procent rozpoznań dodatnich (PPC) i procent rozpoznań ujemnych (PNC) dla docelowych małych wariantów DNA oraz docelowych wariantów fuzji RNA na wysokim poziomie określono jako pierwszorzędowe punkty końcowe. PPC i PNC dla docelowych małych wariantów DNA oraz docelowych wariantów fuzji RNA na niskim poziomie obliczono jako drugorzędowe punkty końcowe. Dwustronne 95-procentowe przedziały ufności (CI) powiązane ze wszystkimi punktami końcowymi obliczono metodą punktacji Wilsona. Analizy główne przeprowadzono w celu oszacowania PPC i PNC (z powiązanymi 95% CI) wśród docelowych próbek panelu o wysokim poziomie poprzez połączenie obserwacji w teście TSO Comprehensive (EU) dla danego celu w grupie próbek panelu reprezentujących odpowiednią klasę wariantów (tj. małe warianty DNA i fuzje RNA) z uwzględnieniem wszystkich ośrodków/aparatów, operatorów i przebiegów. Dla każdego docelowego wariantu w celu obliczenia PNC połączono obserwacje z testu TSO Comprehensive (EU) próbek innego panelu o wysokim poziomie, ukierunkowanych na ten sam typ wariantu, ale niezawierających tego samego wariantu, zgodnie z zasadą większości. Ogólne PPC i PNC dla docelowych próbek panelu o niskim poziomie określono w podobny sposób.

Małe warianty DNA genu RET

W przypadku próbek panelu o wysokim poziomie małego wariantu DNA ogólny PPC wynosił 100,0% (207/207; 95% CI: 98,2% do 100,0%) ([Tabela 53](#)). Ogólny PNC dla próbek panelu o wysokim poziomie małego wariantu DNA wynosił 100,0% (1035/1035; 95% CI: 99,6% do 100,0%) ([Tabela 54](#)). W przypadku docelowych próbek

panelu o niskim poziomie małych wariantów DNA ogólny PPC dla docelowych próbek panelu o niskim poziomie małych wariantów DNA wynosił 99,1% (210/212; 95% CI: 96,6% do 99,7%), a ogólny PNC wynosił 100,0% (1026/1026; 95% CI: 99,6% do 100,0%).

Tabela 53 PPC testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku wykrywania małych wariantów DNA genu RET w docelowych próbkach panelu o wysokim i niskim poziomie

Poziom wariantu	Rodzaj wariantu	Wariant docelowy (nukleotyd)	Wariant docelowy (aminokwas)	N	Średnia VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95% CI ²
ok. 2–3 × 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)
	Delecja	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Insercja	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Wszystkie małe warianty	Wszystkie małe warianty	Wszystkie małe warianty	207	Nd. ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
	DNA o wysokim poziomie	DNA o wysokim poziomie	DNA o wysokim poziomie				
ok. 1 × 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)
	Delecja	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Insercja	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Wszystkie małe warianty	Wszystkie małe warianty	Wszystkie małe warianty	212	Nd. ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)
	DNA o niskim poziomie	DNA o niskim poziomie	DNA o niskim poziomie				

¹ Skrót: nd., nie dotyczy; VAF, częstość allelu wariantowego.

² 95% 2-stronny przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

Tabela 54 PNC testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku wykrywania małych wariantów DNA genu RET w docelowych próbkach panelu o wysokim i niskim poziomie

Poziom wariantu	Rodzaj wariantu	Wariant docelowy (nukleotyd)	Wariant docelowy (aminokwas)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% CI ²
ok. 2–3 × 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)
	Delecja	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insercja	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Wszystkie małe warianty DNA o wysokim poziomie	Wszystkie małe warianty DNA o wysokim poziomie	Wszystkie małe warianty DNA o wysokim poziomie	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
ok. 1 × 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)
	Delecja	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insercja	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Wszystkie małe warianty DNA o niskim poziomie	Wszystkie małe warianty DNA o niskim poziomie	Wszystkie małe warianty DNA o niskim poziomie	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Wszystkie obserwacje zebrane z kombinacji próbka panelu–wariant, dla których w większości rozpoznanie jest ujemne (docelowe warianty niosące fuzję przy mniej niż 50% rozpoznań dodatnich).

² 95% 2-stronny przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

W Tabeli 55 przedstawiono analizę składowych wariancji częstości allelu wariantu (VAF) dla każdej próbki panelu, obejmującą około 36 obserwacji. Odchylenie standardowe (SD) i względny współczynnik zmienności (%CV; łącznie i dla każdego źródła) zostały obliczone i przedstawione dla każdej docelowej próbki małego wariantu DNA genu RET.

Tabela 55 Analiza komponentów wariancji testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku VAF wśród docelowych próbek panelu małych wariantów DNA

Poziom wariantu	Rodzaj wariantu	Wariant docelowy (nukleotyd)	Wariant docelowy (aminokwas)	N	Średnia VAF	SD dla ośrodka (%CV)	SD dla operatora (%CV)	SD dla dnia (%CV)	SD dla powtórzeń (%CV)	Całkowite SD (%CV)
ok. 2–3 × 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)
	Delecja	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)
	Insercja	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)
ok. 1 × 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)
	Delecja	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)
	Insercja	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)

Fuzje genów NTRK 1–3 i RET

W przypadku próbek panelu o wysokim poziomie fuzji RNA ogólny PPC wynosił 99,3% (285/287; 95% CI: 97,5% do 99,8%) ([Tabela 56](#)). PPC wynosił 100% dla każdej próbki panelu o wysokim poziomie z wyjątkiem próbki BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; 95% CI: 81,9% do 98,5%]). Ogólny PNC dla próbek panelu o wysokim poziomie fuzji RNA wynosił 100,0% (1724/1724; 95% CI: 99,8% do 100,0%) ([Tabela 57](#)). W przypadku próbek panelu o niskim poziomie fuzji docelowego RNA ogólny PPC wynosił 95,4% (272/285; 95% CI: 92,3%, 97,3%), a ogólny PNC wynosił 100,0% (1851/1851; 95% CI: 99,8% do 100,0%).

Tabela 56 PPC testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku wykrywania fuzji genów NTRK i RET wśród docelowych próbek panelu o wysokim i niskim poziomie

Poziom wariantu	Fuzja sekwencji docelowej	N	Średnia odczytów potwierdzających	PPC (%) (n/N)	95% CI*
ok. 2– 3 × 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)
	Wszystkie fuzje wys.	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
ok. 1 × 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)
	Wszystkie fuzje nis.	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* 95% dwustronny przedział ufności (CI) obliczono metodą punktacji Wilsona.

Tabela 57 PNC testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku wykrywania fuzji genów NTRK i RET wśród niedocelowych próbek panelu o wysokim i niskim poziomach

Poziom wariantu	Fuzje docelowe	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% CI ²
ok. 2–3 × 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)
	Wszystkie fuzje – wys	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
ok. 1 × 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)
	Wszystkie fuzje – nis.	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Wszystkie obserwacje zebrane z kombinacji próbka panelu–wariant, dla których w większości rozpoznanie jest ujemne (docelowe warianty niosące fuzje przy mniej niż 50% rozpoznań dodatnich).

² 95% dwustronny przedział ufności (CI) obliczono metodą punktacji Wilsona.

Tabela 58 przedstawia analizę składowych wariacji odczytów potwierdzających wśród mniej więcej 36 obserwacji w ramach każdej fuzji docelowej. Wartości SD i %CV (łącznie i dla każdego źródła) obliczono i przedstawiono dla każdej fuzji docelowej.

Tabela 58 Analiza składowych wariacji testu TSO Comprehensive (EU) dla odczytów potwierdzających wśród docelowych próbek panelu fuzji RNA

Poziom wariantu	Fuzja	N	Średnia odczytów potwierdzających	SD dla ośrodka (%CV)	SD dla operatora (%CV)	SD dla dnia (%CV)	SD dla powtórzeń (%CV)	Całkowite SD (%CV)
ok. 2–3 × 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)
ok. 1 × 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)

Badanie 2

Drugie badanie przeprowadzono, aby ocenić odtwarzalność testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku 3 ośrodków badawczych (2 zewnętrznych i 1 wewnętrznego), 2 operatorów/aparatów na ośrodek, 3 unikatowych partii odczytników, 4 dni testowania (niekolejnych) i 2 przebiegów sekwencjonowania na bibliotekę próbek.

Testowanie przeprowadzono przy użyciu wyekstrahowanych próbek DNA i RNA z 41 próbek tkanki FFPE i 1 preparatu FFPE linii komórkowej (przy czym 1 próbkę tkanki FFPE i preparat FFPE linię komórkową wykorzystano do utworzenia 2 elementów panelu z każdej). Próbki tkanki obejmowały następujące typy: pęcherz, kość, mózgowie, sutek, jelito grube, jelito czcze, nerka, wątroba, płuco, jajnik, gruczoł krokowy, skóra, tkanka miękka, żołądek, tarczyca i macica. Zbadano łącznie 44 próbki panelu, w tym próbki DNA panelu z małymi wariantami DNA (SNV, MNV, insercje i delecje), amplifikacjami genów, różnymi wynikami TMB i wysokimi wynikami MSI oraz próbki panelu RNA z fuzjami genów i wariantami splicingowymi. Większość próbek panelu charakteryzowała się poziomem znanych wariantów docelowych od około 2- do 3-krotności granicy wykrywalności specyficznej dla wariantu (ok. 2–3×LoD).

LoD to stężenie analitu, przy którym obserwowane wyniki testu są „dodatnie” (wariant wykryty względem wartości granicznej testu TSO Comprehensive (EU)) w $\geq 95\%$ przypadków. Średnie obserwowane poziomy wariantów zostały zaklasyfikowane jako mniej więcej $< 2 \times \text{LoD}$ (obserwowane poziomy wariantów przy $< 1,5 \times \text{LoD}$), ok. $2-3 \times \text{LoD}$ (obserwowane poziomy wariantów przy $1,5 \times \text{LoD}$ do $3,4 \times \text{LoD}$) i ok. $> 3 \times \text{LoD}$ (obserwowane poziomy wariantów przy $> 3,4 \times \text{LoD}$).

Procent rozpoznań dodatnich (PPC) dla małych wariantów DNA, amplifikacji genów, MSI-High i wariantów RNA został obliczony przez połączenie obserwacji z różnych przebiegów sekwencjonowania i stanowisk. Procent rozpoznań ujemnych (PNC) został podobnie obliczony dla małych wariantów DNA, amplifikacji genów oraz wariantów RNA. Dla każdego znanego wariantu docelowego obserwacje z testu TSO Comprehensive (EU) w próbkach panelu o tym samym typie wariantu, ale zawierających inne warianty, nie pochodzące z tej samej próbki źródłowej i niespełniające reguły większości dla tego wariantu (tj. $< 50\%$ rozpoznań było dodatnich), zostały połączone dla różnych ośrodków, operatorów/aparatów, dni, partii odczynników i przebiegów sekwencjonowania w celu obliczenia PNC. Dwustronne 95-procentowe przedziały ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

Małe warianty DNA

Tabela 59 przedstawia PPC dla docelowych małych wariantów DNA. PPC mieściły się w zakresie od 91,3% dla SNV genu BRAF do 100% dla większości małych wariantów DNA.

Tabela 59 PPC testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku wykrywania małych wariantów DNA w próbkach połączonego panelu docelowego

Obserwowany poziom wariantu ¹	Rodzaj wariantu	Wariant docelowy (nukleotyd)	Wariant docelowy (aminokwas)	Średnia VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
ok. $2-3 \times \text{LoD}$	DELECJA	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
ok. $2-3 \times \text{LoD}$	DELECJA	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
ok. $2-3 \times \text{LoD}$	INSERCJA	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
ok. $2-3 \times \text{LoD}$	INSERCJA	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
$< 2 \times \text{LoD}$	INSERCJA	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0; 100,0)
ok. $2-3 \times \text{LoD}$	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)

Obserwowany poziom wariantu ¹	Rodzaj wariantu	Wariant docelowy (nukleotyd)	Wariant docelowy (aminokwas)	Średnia VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
ok. 2–3 × LoD	DELECJA	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	DELECJA	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	INSERCJA	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	INSERCJA	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	DELECJA	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
<2 × LoD	INSERCJA	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	INSERCJA	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Poziom wariantu obliczony na podstawie średniej obserwowanej częstości allelu wariantowego.

² Średnia częstość allelu wariantowego obliczona na podstawie obserwowanych wyników testu.

³ 95% dwustronny przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

PNC wynosiły 100% dla małych wariantów DNA.

Tabela 60 przedstawia analizę składowych wariancji wyników VAF dla każdego źródła zmienności i zmienności całkowitej we wszystkich próbkach panelu z docelowymi małymi wariantami DNA.

Tabela 60 Analiza składowych wariancji VAF dla docelowych małych wariantów DNA

Wariant docelowy (nukleotyd)	N	Średnia VAF	SD dla ośrodka (%CV)	SD dla operatora (ośrodka) (%CV)	SD dla dnia (ośrodek, operatora) (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla przebiegu (%CV)	Całkowite 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)

Dla dwóch docelowych małych wariantów DNA liczba obserwacji była zbyt mała, aby można było dopasować model składowych wariancji. W przypadku tych dwóch docelowych wariantów całkowite SD wynosiły 0,027 w przypadku wariantu chr1_27024001_C_CG oraz 0,001 w przypadku wariantu chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Amplifikacje genów

W [Tabela 61](#) przedstawiono PPC dla amplifikacji docelowych genów. PPC wynosiły 100,0% w przypadku MET oraz 100,0% w przypadku ERBB2.

Tabela 61 PPC testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku wykrywania amplifikacji genów w próbkach tworzących połączony panel sekwencji docelowych

Obserwowany poziom wariantu ¹	Wariant docelowy	Średnia obserwowana krotność zmiany ²	Procent rozpoznań dodatnich (%)	95% CI ³
ok. 2–3 × LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Poziom wariantu obliczono na podstawie średniej obserwowanej krotności zmiany.

² Średnią krotność zmiany obliczono na podstawie obserwowanych wyników testu.

³ 95% dwustronny przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

Wśród amplifikacji genów PNC wynosiły 100%.

[Tabela 62](#) przedstawia analizę składowych wariancji wyników krotności zmiany dla każdego źródła zmienności i zmienności całkowitej we wszystkich próbkach panelu z amplifikacjami docelowych genów.

Tabela 62 Analiza składowych wariancji krotności zmiany dla amplifikacji docelowych genów

Wariant docelowy	N	Średnia krotność zmiany	SD dla ośrodka (%CV)	SD dla operatora (ośrodek) (%CV)	SD dla dnia (ośrodek, operatora) (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla przebiegu (%CV)	Całkowite 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

Tabela 63 przedstawia PPC dla docelowych próbek panelu wykazujących MSI-High. PPC wynosiły 100% dla obu próbek panelu wykazujących MSI-High.

Tabela 63 PPC testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku wykrywania statusu MSI-High w próbkach połączonego panelu docelowego

Próbka panelu	Średni wynik MSI ¹	N	Procent rozpoznań dodatnich (%)	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)
Wszystkie próbki		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Średni obserwowany wynik MSI obliczony na podstawie obserwowanych wyników testu.

² 95% dwustronny przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

Tabela 64 przedstawia analizę składowych wariancji dla wyniku MSI dla każdego źródła zmienności i zmienności całkowitej we wszystkich próbkach panelu o docelowym statusie MSI-High.

Tabela 64 Analiza składowych wariancji wyniku MSI dla próbek panelu o docelowym statusie MSI-High

Próbka panelu	N	Średni wynik MSI	SD dla ośrodka (%CV)	SD dla operatora (ośrodek) (%CV)	SD dla dnia (ośrodek, operatora) (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla przebiegu (%CV)	Całkowite 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

Aby ocenić odtwarzalność wyników TMB, przeprowadzono ilościową analizę wyniku w przypadku docelowych próbek panelu TMB, które reprezentowały zakres oczekiwanych wyników TMB. **Tabela 65** przedstawia analizę składowych wariancji wyników TMB dla każdego źródła zmienności i zmienności całkowitej w próbkach panelu TMB. Całkowite SD dla wyniku TMB wynosiły 1,0 (%CV = 13) w przypadku jednej z próbek panelu (średni wynik TMB = 7,6) i 1,1 (%CV = 2) w przypadku innej próbki tego panelu (średni wynik TMB = 63,2).

Tabela 65 Analiza składowych wariancji wyniku TMB dla próbek panelu, docelowych pod kątem TMB

Próbka panelu*	N	Średni wynik TMB	SD dla ośrodka (%CV)	SD dla operatora (ośrodek) (%CV)	SD dla dnia (ośrodek, operatora) (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla przebiegu (%CV)	Całkowite 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)

* W wypadku jednej próbki panelu TMB liczba obserwacji była zbyt mała (N = 2), aby można było dopasować model składowych wariancji. W przypadku tej próbki panelu całkowite SD wynosiło 1,7.

Warianty RNA

[Tabela 66](#) przedstawia PPC dla docelowych wariantów RNA. PPC mieściły się w zakresie od 91,7% dla KIF5B-RET do 100% dla większości wariantów RNA.

Tabela 66 PPC testu TSO Comprehensive (EU) w przypadku wykrywania wariantów RNA w próbkach połączonego panelu docelowego

Obserwowany poziom wariantu ¹	Rodzaj wariantu	Wariant docelowy	Średnia odczytów potwierdzających ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
>3 × LoD	Fuzja	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzja	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzja	CD74- ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzja	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzja	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzja	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzja	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	Fuzja	DHX8;ETV4- STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzja	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzja	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzja	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzja	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzja	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzja	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzja	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)

Obserwowany poziom wariantu ¹	Rodzaj wariantu	Wariant docelowy	Średnia odczytów potwierdzających ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
<2 × LoD	Fuzja	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Fuzja	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
>3 × LoD	Wariant splicingowy	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
ok. 2–3 × LoD	Wariant splicingowy	MET exon 14 skipping	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Poziom wariantu obliczono na podstawie średniej obserwowanych odczytów potwierdzających.

² Średnią odczytów potwierdzających obliczono na podstawie obserwowanych wyników testu.

³ 95% dwustronny przedział ufności obliczono metodą punktacji Wilsona.

PNC wynosił 100% dla każdego docelowego wariantu RNA, z wyjątkiem fuzji FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60% (984/988; 95% CI: 98,96% do 99,84%)).

Tabela 67 przedstawia analizę składowych wariancji wyników odczytów potwierdzających dla każdego źródła zmienności i zmienności całkowitej we wszystkich próbkach panelu z docelowymi wariantami RNA.

Tabela 67 Analiza składowych wariancji odczytów potwierdzających dla docelowych wariantów RNA

Wariant docelowy	N	Średnia odczytów potwierdzających	SD dla ośrodka (%CV)	SD dla operatora (ośrodka) (%CV)	SD dla dnia (ośrodka, operatora) (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla przebiegu (%CV)	Całkowite 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)
Wariant splicingowy EGFR vIII	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Wariant splicingowy MET z pominiętym eksonem 14	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna

Przeprowadzono dwa badania w celu oceny wewnątrzlaboratoryjnej precyzji testu TSO Comprehensive (EU). W badaniu 1 oceniano fuzje NTRK i RET oraz małe warianty RET DNA. W badaniu 2 oceniano TMB i MSI.

Badanie 1

Precyzja wewnątrzlaboratoryjna została oceniona dla fuzji NTRK1–3 (glejaka niskiego stopnia zezłośliwienia, glejaka wielopostaciowego, mięsaka miofibroblastycznego, wydzielniczego raka sutka), fuzji RET (rak tarczycy i tkanka skóry z nieznanym nowotworem) oraz małych wariantów RET DNA (rak rdzeniasty tarczycy) w tkankach FFPE ze wskazanymi nowotworami. Każda próbka została przetestowana na dwóch poziomach

wariantów: ok. 1× LoD (niski poziom wariantu) oraz ok. 2–3× LoD (wysoki poziom wariantu), z wyjątkiem próbki zawierającej CCDC6-RET, która była testowana tylko na niskim poziomie wariantu. Każdą z próbek na każdym poziomie testu analizowano w dwóch powtórzeniach dla każdego przygotowania biblioteki przez trzech (3) operatorów. Każdy operator rozpoczynał przygotowywanie biblioteki w trzech (3) nienastępujących po sobie dniach i wykonywał sekwencjonowanie na trzech (3) wyznaczonych aparatach NextSeq 550Dx. Przetestowano trzy (3) partie odczynników, co pozwoliło wygenerować 54 obserwacje na każdym poziomie. W przypadku niektórych poziomów uzyskano mniej niż 54 obserwacje z powodu nieprawidłowych bibliotek.

Analiza jakościowa

Jakościowa zgodność rozpoznawania wariantów została oceniona oddzielnie dla dwóch poziomów wariantów dla danego wariantu na podstawie spulowanych obserwacji wśród wszystkich zmiennych (operatorzy, partie odczynników, aparaty, dni i powtórzenia). Odsetek rozpoznań dodatnich (PPC) i odsetek rozpoznań ujemnych (PNC) oraz powiązany dwustronny 95% przedział ufności (metoda Wilsona) zostały podsumowane w [Tabela 68](#) (małe warianty DNA) oraz [Tabela 69](#) (fuzje RNA).

Przy wysokim poziomie wariantu (ok. 2–3× LoD) test TSO Comprehensive (EU) wykazał 100% dla PPC i PNC w przypadku wszystkich testowanych wariantów.

Przy niskim poziomie wariantu (ok. 1× LoD) PPC dla małych wariantów DNA mieścił się w zakresie od 83,3% do 98,1%, a PPC dla fuzji RNA mieścił się w zakresie od 90,7% do 100%. W przypadku wariantów z PPC <95% średnie wartości VAF (RET C634Y i RET D898_E901del) lub odczyty potwierdzające (NCOA4-RET i BCAN-NTRK1) wypadały poniżej odpowiednich granic wykrywalności. Przy niskim poziomie wariantu 100% PNC osiągnięto dla wszystkich wariantów.

Tabela 68 Wyniki jakościowe dla docelowych wariantów DNA

Poziom wariantu	Wariant	Rodzaj wariantu	Średnia VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
ok. 1 x 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	DELECJA	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*	DELECJA	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Poziom wariantu	Wariant	Rodzaj wariantu	Średnia VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
ok. 3 × LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	DELECJA	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*	DELECJA	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Zmiany nukleotydów są wymienione dla każdego wariantu w części „Granica wykrywalności” z wyjątkiem RET D631_L633delinsE, występującego na chromosomie 10, w pozycji 43609940, odniesienie ACGAGCT, alternatywa A.

Tabela 69 Wyniki jakościowe dla docelowych fuzji RNA

Poziom wariantu	Fuzja	Średnia odczytów potwierdzających	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
ok. 1 × 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 (preparat FFPE linii komórkowej)	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 (próbka 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (próbka 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Poziom wariantu	Fuzja	Średnia odczytów potwierdzających	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
ok. 2– 3 × 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 (preparat FFPE linii komórkowej)	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	Nd.	Nie badano	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (próbka 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (próbka 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Analiza ilościowa

Przeprowadzono analizę składowych wariancji warunkowej maksymalnej wiarygodności (REML) w celu oceny całkowitej zmienności zasadniczej zmiennej ciągłej (VAF dla małych wariantów DNA i odczyty potwierdzające dla fuzji RNA) oraz oszacowania składowych precyzji [odchylenie standardowe (SD), współczynnik zmienności (CV)] dla każdego źródła zmienności [operatorzy, aparaty, dni, partie odczynników, pozostałości i łącznie]. Wyniki przedstawiono w [Tabela 70](#) dla małych wariantów DNA i [Tabela 71](#) dla fuzji RNA.

Zmienność VAF wzrastała wraz ze średnią zgodnie z oczekiwaniami dla proporcji dwumianowej. Zmienność odczytów potwierdzających wzrastała wraz ze średnią, jak oczekiwano w przypadku danych zliczeń.

Komponent resztkowy w największym stopniu przyczyniał się do całkowitej zmienności zarówno małych wariantów DNA, jak i fuzji RNA na obu poziomach, co potwierdza wniosek, że wykrywanie tych wariantów za pomocą testu TSO Comprehensive (EU) jest wiarygodne, niezależnie od operatorów, partii, aparatów i dni.

Tabela 70 Ilościowe wyniki SD i CV dla docelowych małych wariantów DNA

Poziom VAF	Wariant	Rodzaj wariantu	N ważnych prób	Średnia VAF	SD dla operatora (%CV)	SD dla aparatu (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla dnia (%CV)	Resztkowe SD (%CV)	Całkowite SD (%CV)
ok. 1 × LoD	RET D898_E901del	DELECJA	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	DELECJA	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)
ok. 3 × LoD	RET D898_E901del	DELECJA	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	DELECJA	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)

Tabela 71 Ilościowe wyniki SD i CV dla fuzji RNA w sekwencjach docelowych

Poziom odczytów potwierdzających	Fuzja	N ważnych prób	Średnia odczytów potwierdzających	SD dla operatora (%CV)	SD dla aparatu (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla dnia (%CV)	Resztkowe SD (%CV)	Całkowite SD (%CV)
ok. 1 × 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 (linia komórkowa)	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 (próbka 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (próbka 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Poziom odczytów potwierdzających	Fuzja	N ważnych prób	Średnia odczytów potwierdzających	SD dla operatora (%CV)	SD dla aparatu (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla dnia (%CV)	Resztkowe SD (%CV)	Całkowite SD (%CV)
2–3 × LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (linia komórkowa)	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 (próbka 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (próbka 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Badanie 2

Precyzję wewnątrzlaboratoryjną oceniono dla TMB i MSI. Do oceny precyzji na różnych poziomach w całym zakresie wyników wykorzystano pięć próbek NSCLC FFPE DNA w przypadku TMB i siedem próbek CRC FFPE w przypadku MSI, w tym zarówno próbki wykazujące stabilność mikrosatelitarną (MS-Stable), jak i wysoką niestabilność (MSI-High). Każda z próbek była badana w dwóch powtórzeniach przez trzech (3) operatorów w ciągu trzech (3) dni dla trzech (3) bibliotek i trzech (3) partii odczynników przy użyciu trzech (3) aparatów NextSeq 550Dx, co pozwoliło wygenerować 54 obserwacje na każdym poziomie.

Zgodność jakościową oceniano w przypadku statusu MSI. Test TSO Comprehensive (EU) wykazał 100% zgodność dla procentu rozpoznań dodatnich i procentu rozpoznań ujemnych w przypadku statusu MSI. W przypadku TMB test TSO Comprehensive (EU) zgłasza wynik TMB; zgodność jakościowa nie ma zastosowania.

Całkowitą zmienność wyników TMB i MSI, wraz z udziałem danego źródła (aparaty, operatorzy, partie, dni i komponenty rezydualne), określono ilościowo przy użyciu modelu składowych wariancji w szerokim zakresie wyników. Odchylenie standardowe (SD) oraz współczynnik zmienności (CV) przedstawiono w [Tabela 72](#) w przypadku TMB i [Tabela 73](#) w przypadku MSI w podziale na poziomy. W przypadku niektórych poziomów uzyskano mniej niż 54 obserwacje z powodu nieprawidłowych bibliotek.

Tabela 72 Wyniki SD i CV dla ilościowego wyniku TMB

Poziom	Średni wynik TMB	N ważnych prób	SD dla operatora (%CV)	SD dla aparatu (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla dnia (%CV)	Resztkowe SD (%CV)	Całkowite 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)

Poziom	Średni wynik TMB	N ważnych prób	SD dla operatora (%CV)	SD dla aparatu (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla dnia (%CV)	Resztkowe SD (%CV)	Całkowite SD (%CV)
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)

Tabela 73 Wyniki SD i CV dla ilościowego wyniku MSI

Status MSI	Poziom	Średni wynik MSI (%)	N ważnych prób	SD operatora (%CV)	SD dla aparatu (%CV)	SD dla partii (%CV)	SD dla dnia (%CV)	Resztkowe SD (%CV)	Całkowite SD (%CV)
Stabilność mikrosatelitarna	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)
Wysoka niestabilność mikrosatelitarna	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)

Zmienność wyników TMB ma tendencję do wzrostu wraz ze średnią, jak oczekiwano na podstawie teoretycznych rozkładów danych zliczeń. Zmienność wyników MSI w przypadku poziomów zbliżonych do wyniku MSI = 50 jest większa niż zmienność wyników MSI bliższa 0 lub 100, zgodnie ze zmiennością teoretycznych rozkładów danych proporcji. Komponent resztkowy pozostał najistotniejszym czynnikiem wpływającym na całkowitą wariancję zarówno w przypadku wyników MSI, jak i TMB, co potwierdza wniosek, że wyniki są wiarygodne niezależnie od operatorów, partii, aparatów i dni. Jednakże, ponieważ zarówno MSI, jak i TMB są złożonymi markerami biologicznymi, wydajność analityczna może się różnić pomiędzy próbkami. Oznacza to, że zmienność TMB zależy nie tylko od wartości samego TMB, ale także od składu wariantów w próbce, tj. typu wariantu (SNV, polimorfizm typu indel), i poziomu VAF (bliskość punktu odcięcia włączenia). Podobnie zmienność MSI zależy nie tylko od wartości MSI, ale także od składu miejsc w próbce, tj. od liczby miejsc, które są niestabilne i stopnia niestabilności w danym miejscu.

Wartości C5 i C95 w okolicy punktu odcięcia wynoszącego 20,00% zostały ustalone dla MSI za pomocą profilu precyzji (Tabela 74).

Tabela 74 Przedział C5–C95 dla MSI

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

Oceniono wpływ odsetka komórek nowotworowych na wyniki TMB i MSI. W przypadku większości próbek odsetek komórek nowotworowych $\geq 30\%$ miał nieistotny wpływ na wyniki TMB powyżej około 10 mutacji na milion par zasad. Wyniki TMB pozostawały względnie niezmiennione przy rosnącym odsetku komórek nowotworowych. W przypadku próbek o wysokiej niestabilności mikrosatelitarnej odsetek komórek nowotworowych charakteryzował się dodatnią, liniową korelacją z wynikiem MSI. Próbkę o wysokiej niestabilności mikrosatelitarnej pozostawały przeciętnie MSI-High, kiedy odsetek komórek nowotworowych

wynosił $\geq 30\%$. Próbkki endometrium zachowywały się wyraźnie inaczej niż pozostałe próbki innych typów tkanek i stwierdzono, że do rozpoznania ich jako MSI-High potrzebna jest większa zawartość komórek nowotworowych.

Dokładność profilowania nowotworu

Wykrywanie wariantów za pomocą testu TSO Comprehensive (EU) porównano z wynikami uzyskanymi metodami referencyjnymi. Wykrywanie małych wariantów DNA i TMB porównano z wynikami uzyskanymi zewnętrzną zwalidowaną metodą NGS całego eksomu. Amplifikacje genów porównano z wynikami uzyskanymi tą samą metodą NGS całego eksomu lub zwalidowaną metodą podwójnej hybrydyzacji in situ (DISH) dla amplifikacji HER2. MSI oceniano na podstawie zwalidowanego testu MSI-PCR. Warianty splicingowe RNA porównano ze zwalidowaną metodą ilościowej PCR (qPCR). Fuzje ROS1 i ALK porównano ze zwalidowanymi testami FISH. Wszystkie inne fuzje porównano z metodą złożoną składającą się ze zwalidowanego testu NGS całego eksomu RNA (RNGS1), docelowego panelu NGS (RNGS2) i emulsyjnej PCR (ddPCR).

Wykrywanie małych wariantów DNA

Wykrywanie małych wariantów DNA za pomocą testu TSO Comprehensive (EU) porównano z wynikami sekwencjonowania całego eksomu (WES), w której to metodzie wykorzystuje się dopasowane pary próbek tkanek prawidłowych i próbek nowotworu do rozpoznania małych wariantów w linii germinalnej i małych wariantów somatycznych. Porównanie pomiędzy małymi wariantami, składającymi się z substytucji pojedynczego nukleotydu (SNV), insercji i delecji, było oparte na 124 próbkach z 14 różnych typów tkanek, które były ważne zarówno dla testu TSO Comprehensive (EU), jak i metody WES. TSO Comprehensive (EU), a nie test WES, może wykryć warianty wielonukleotydowe (MNVs, 2–3 bp), co wymaga fazowania. TSO Comprehensive (EU) MNV oceniano jako pojedyncze SNV względem metody WES. Podsumowanie zgodności na poziomie wariantów, w tym procentową zgodność wyników dodatnich (PPA) i procentową zgodność wyników ujemnych (NPA) dla wszystkich rozpoznań wariantów przedstawiono w [Tabela 75](#).

Tabela 75 Podsumowanie zgodności dla rozpoznań małych wariantów ocenianych na podstawie statusu linii germlinalnej lub statusu linii somatycznej

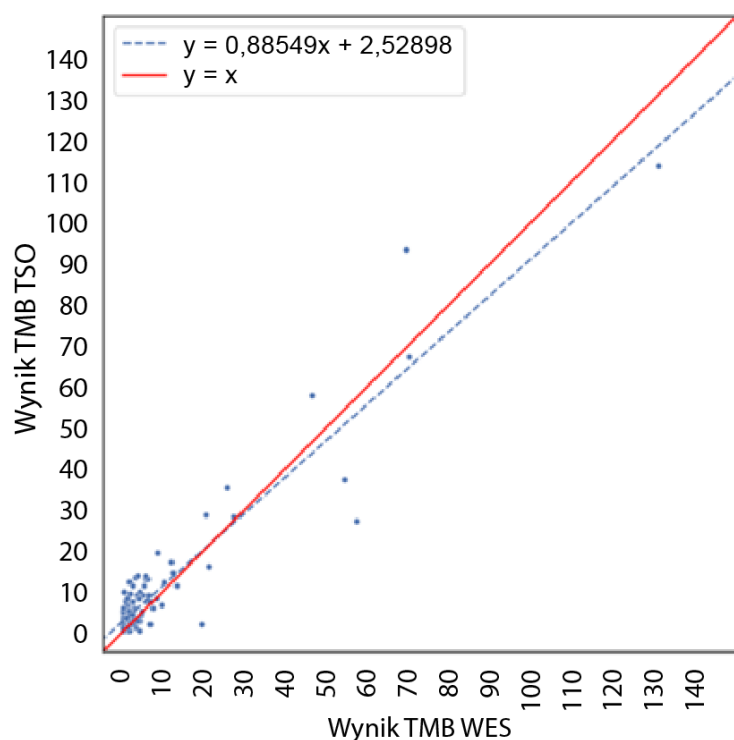
	WES, linia somatyczna, rozpoznanie	WES Germline Called	WES, brak rozpoznania
TSO Comprehensive (EU) rozpoznanie	382	33 163	426
TSO Comprehensive (EU) brak rozpoznania	69	61	70 000 481
Łącznie	451	33 224	70 000 907
Procent wyników zgodnych	PPA: 85% (382/451), 95% CI: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33 163/33 224) 95% CI: [99,8%, 99,9%]	NPA: > 99% (70 000 481/70 000 907) 95% CI: [99,999%, 99,999%]

Łącznie test TSO Comprehensive (EU) rozpoznał 426 wariantów, które nie zostały wykryte metodą WES. Dwieście cztery (48%) spośród tych wariantów cechowała częstość allelu wariantowego poniżej progu rozpoznania metodą WES. W przypadku pozostałych potencjalnych wariantów fałszywie dodatnich istniały dowody na rozpoznanie wariantu metodą WES z niskim poparciem. Ponadto w przypadku wielu wariantów poziom świadectw w metodzie WES był bardzo niski w dopasowanych próbkach prawidłowych. Sugeruje to, że warianty te zostały przez WES pominięte w próbkach nowotworowych z powodu zanieczyszczenia próbek prawidłowych utkaniem nowotworowym.

Wykrywanie obciążenia mutacyjnego komórek nowotworowych

Zgodność TMB określono poprzez porównanie wyników TMB (mutacje somatyczne/milion par zasad) pomiędzy metodą WES i TSO Comprehensive (EU) dla 124 próbek, dla których były dane dostępne uzyskane zarówno testem TSO Comprehensive (EU), jak i WES. Analiza metodą regresji liniowej z WES jako czynnikiem predykcyjnym wykazała wartość wyrazu wolnego wynoszącą 2,53, współczynnika nachylenia 0,89 i współczynnika korelacji Pearsona 0,94 ([Rysunek 3](#)).

Rysunek 3 Korelacja wyników TMB między WES a TSO Comprehensive (EU)



Wykrywanie amplifikacji genów

Wykrywanie amplifikacji genów w teście TSO Comprehensive (EU) porównano z wynikami tego samego testu WES przy użyciu próbek guzów dopasowanych do próbek prawidłowych lub próbek zawierających tylko materiał guza. Ogółem analizą objęto 420 próbek, z których w przypadku 183 użyto metody ortogonalnej guz-tkanka prawidłowa, a w przypadku 237 użyto metody dotyczącej wyłącznie guza. Spośród 420 próbek do badania wybrano 50 próbek, ponieważ były one amplifikacyjne z wynikiem dodatnim z TSO Comprehensive (EU) lub oznaczeniem poprzednika. Wydajność tych scharakteryzowanych próbek dostosowano przy użyciu średniej częstości występowania fuzji. Połączona wydajność w scharakteryzowanych i niecharakteryzowanych próbkach wykorzystywała średnią ważoną odwróconą wariancję. Próbki pochodziły z 14 typów tkanek i zawierały amplifikacje 55 genów. TSO Comprehensive (EU) raportuje amplifikacje genów MET i ERBB2. Jednakże dokładność została oceniona w przypadku wszystkich 55 genów. Podsumowanie rozpoznań amplifikacji genów przedstawiono w [Tabela 76](#).

Tabela 76 Podsumowanie zgodności dla amplifikacji genów

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

* Przedział ufności obliczony metodą bootstrap.

Amplifikacje ERBB2 (HER2) w tkankach żołądka i sutka analizowano niezależnie od innych amplifikacji genów metodą podwójnej hybrydyzacji in situ (DISH). Łącznie przebadano 116 próbek tkanek sutka i żołądka, z których 64 zostały wcześniej scharakteryzowane jako pozytywne pod względem HER2 techniką IHC lub FISH. W przypadku jednej próbki doszło do niepowodzenia na etapie ekstrakcji, w przypadku 3 próbek doszło do niepowodzenia w teście TSO Comprehensive (EU), a w przypadku 4 próbek doszło do niepowodzenia w teście DISH. Spośród 108 próbek 20 (18,5%) dało wyniki graniczne (w zakresie od 1,5 do 2,5) w pobliżu punktu odcięcia dla metody DISH wynoszącego 2,0. Wyniki zgodności, w tym PPA, NPA dla wszystkich próbek, a także po wykluczeniu granicznych przypadków HER2 w metodzie DISH, przedstawiono w [Tabela 77](#).

Tabela 77 Podsumowanie zgodności pomiędzy testem TSO Comprehensive i HER2 DISH, w tym dla amplifikacji genu HER2

Amplifikacja genu HER2 Wszystkie (tkanki sutka i żołądka)	Zamplifikowany HER2 techniką DISH	Niezamplifikowany HER2 techniką DISH
TSO Comprehensive (EU) Dodatnie	17 (w tym 1 wartość graniczna)	13 (w tym 1 wartość graniczna)
TSO Comprehensive (EU) Ujemne	10 (w tym 6 wartości granicznych)	68 (w tym 12 wartości granicznych)
Procent wyników zgodnych, w tym przypadki graniczne	PPA: 63% (17/27) 95% CI: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95% CI: [74%, 90%]
Procent wyników zgodnych, z wyłączeniem przypadków granicznych	PPA: 80% (16/20) 95% CI: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95% CI: [72%, 90%]

Wykrywanie niestabilności mikrosatelitarnej

Wykrycie niestabilności mikrosatelitarnej za pomocą testu TSO Comprehensive (EU) porównano z wynikami zwalidowanego testu MSI-PCR, wykorzystując do testów próbki nowotworu dopasowane do próbek prawidłowych. Łącznie porównano 195 próbek spełniających wymagania dotyczące odsetka komórek nowotworowych na poziomie $\geq 30\%$ (do stabilności mikrosatelitarnej) i reprezentujących 14 typów tkanek. Metoda MSI-PCR ocenia 5 miejsc i daje 3 wyniki – MSI-Stable (brak niestabilnych miejsc), MSI-Low (jedno niestabilne miejsce) i MSI-High (dwa lub więcej niestabilnych miejsc). TSO Comprehensive (EU) ocenia do 130 miejsc mikrosatelitarnych i klasyfikuje próbki tylko jako MS-Stable lub MSI-High ($\geq 20\%$ niestabilnych miejsc). Próbkę MSI-Low zgrupowano z wynikami MS-Stable dla techniki MSI-PCR. Analizę zgodności przedstawiono w [Tabela 78](#).

Tabela 78 Podsumowanie analizy zgodności pomiędzy TSO Comprehensive (EU) i MSI-PCR pod kątem niestabilności mikrosatelitarnej DNA

Status MSI	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSI-Stable
TSO Comprehensive (EU) Niestabilny (MSI-High)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabilny (MS-Stable)	3	0	150
Łącznie	44	2	150
Procent wyników zgodnych	PPA: 93% (41/44) 95% CI: [82%, 98%]	NPA: 99% (150/152) 95% CI: [95%, > 99%]	

Wykrywanie wariantów splicingowych RNA

Dokładność wykrywania wariantów splicingowych obliczono poprzez porównanie wyników TSO Comprehensive (EU) z testami qPCR dla EGFRvIII i Met Exon 14 skipping, włączając jeden znany, dodatni pod tym względem, preparat RNA dla każdego z wariantów splicingowych. Analizę zgodności przeprowadzono z wykorzystaniem łącznie 230 unikalnych próbek FFPE RNA z 14 typów tkanek z danymi dostępnymi zarówno w przypadku metody TSO Comprehensive (EU), jak i metody referencyjnej. Wszystkie próbki badano pod kątem MET exon 14 skipping, natomiast EGFRvIII badano odpowiednio tylko w tkance mózgowia. Trzy próbki oznaczone jako dodatnie dla MET exon 14 skipping metodą qPCR, ale nie w teście TSO Comprehensive (EU), miały średnią wartość Ct >37 i były poniżej poziomu LoD TSO Comprehensive (EU). [Tabela 79](#) podsumowuje wyniki badania zgodności.

Tabela 79 Podsumowanie analizy zgodności pomiędzy testem TSO Comprehensive (EU) i qPCR dla wariantów splicingowych RNA

Warianty splicingowe RNA	qPCR, dodatni	qPCR, ujemny
TSO Comprehensive (EU) Dodatnie (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Ujemne (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) Dodatnie (MET exon 14 skipping)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Ujemne (MET exon 14 skipping)	3	217
Łącznie	7	230
Procent wyników zgodnych	PPA: 57% (4/7) 95% CI: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95% CI: [98%, 100%]

Wykrywanie fuzji RNA

Porównanie z metodą złożoną

Fuzje TSO Comprehensive (EU) porównano z metodą złożoną, składającą się z sekwencjonowania całego eksomu RNA za pomocą panelu NGS (RNGS1), docelowego panelu fuzyjnego NGS (RNGS2) i analizy PCR techniką emulsyjną (ddPCR).

Wyniki uzyskane metodą RNGS1 pokrywają się w przypadku wszystkich genów, dla których test TSO Comprehensive (EU) jest w stanie wykryć fuzje. Jednakże granica wykrywalności metody RNGS1 stanowiła od 4- do 8-krotności granicy wykrywalności testu TSO Comprehensive (EU) w oparciu o liczbę odczytów potwierdzających zaobserwowane w rozpoznaniach nakładające się fuzje. Stąd z metodą WES (RNGS1) zastosowano metodę złożoną, wykorzystującą dwie dodatkowe metody o większej czułości, ale mniejszym zakresie dla fuzji.

Łącznie 255 unikalnych próbek RNA reprezentujących 14 typów tkanek i spełniających metryki TSO Comprehensive (EU) zbadano metodą RNGS1. Dwie próbki nie spełniały warunków kontroli jakości próbki RNGS1 i zostały wykluczone z dodatkowej analizy. Spośród 82 fuzji rozpoznanych w teście TSO Comprehensive (EU), 4 zostały wykluczone z oceny z powodu niespełnienia wymogów kontroli jakości próbki RNGS1, a 7 dodatkowych fuzji nie zostało rozpoznanych z powodu braku celów w panelu RNGS1. Spośród pozostałych 71 fuzji rozpoznanych przez test TSO Comprehensive (EU), 9 fuzji zostało potwierdzonych przez RNGS1. Metodą RNGS1 rozpoznano 4 fuzje nierozpoznane przez test TSO Comprehensive (EU).

Spośród 62 fuzji, które wykryto w teście TSO Comprehensive (EU) a nie wykryto techniką RNGS1, 13 pokrywało się i zostało potwierdzonych metodą RNGS2. Jedna fuzja została rozpoznana metodą RNGS2, ale nie została rozpoznana w teście TSO Comprehensive (EU).

Emulsyjny PCR został następnie użyty do weryfikacji fuzji rozpoznanych w teście TSO Comprehensive (EU), nierozpoznanych lub nierozpoznawalnych metodą RNGS1 i niemożliwych do oceny metodą RNGS2 (49). Dodatkowo technikę ddPCR wykorzystano do ponownej oceny 2 z 4 fałszywie ujemnych rozpoznań fuzji dla testu TSO Comprehensive (EU) i RNGS1 i 2 z 9 zgodnych fuzji dla testu TSO Comprehensive (EU) i RNGS1. W celu zapewnienia swoistości, do badania każdej próbki w której stwierdzono fuzję, dołączono pięć próbek w których nie stwierdzono fuzji. Osiemnastu fuzji nie badano techniką ddPCR ze względu na brak możliwości zaprojektowania starterów/sond, wielu partnerów genowych dla fuzji lub niewystarczającą ilość pozostałego materiału FFPE. W przypadku ddPCR startery i sondy zaprojektowano dla punktów pęknięcia obserwowanych w teście TSO Comprehensive (EU).

W sumie 52 fuzje zostały wykryte za pomocą ddPCR, a 41 z nich zostało rozpoznanych przez test TSO Comprehensive (EU), ale nie zostało rozpoznanych lub było nierozpoznawalnych za pomocą RNGS1. Dziewięć fuzji zostało rozpoznanych za pomocą ddPCR, ale nie zostało rozpoznanych w teście TSO Comprehensive (EU) lub RNGS1. Dwie fuzje rozpoznane techniką ddPCR potwierdziły 2 zgodne fuzje w teście TSO Comprehensive (EU) i RNGS1. Metodą ddPCR nie wykryto fuzji dla 2 ponownie ocenionych wyników fałszywie ujemnych w teście TSO Comprehensive (EU) z użyciem metody RNGS1. Zostały one jednak uznane za fałszywie ujemne na podstawie porównania z RNGS1.

Spośród 255 próbek do badania wybrano 35 próbek z dodatnią fuzją z TSO Comprehensive (EU) lub oznaczeniem poprzednika. Wydajność tych scharakteryzowanych próbek dostosowano przy użyciu średniej częstości występowania fuzji. Połączona wydajność w scharakteryzowanych i niecharakteryzowanych próbkach wykorzystywała średnią ważoną odwróconą wariancję. Zgodność wyników uzyskanych metodami złożonymi RNGS1, RNGS2 i ddPCR dla fuzji przedstawiono w [Tabela 80](#).

66 fuzji (54 unikalne fuzje) rozpoznanych zgodnie z metodą złożoną reprezentowało 43 geny w panelu TSO Comprehensive (EU). Jednak fuzje kwalifikują się do zgłoszenia tylko z 23 genów wskazanych w [Tabela 80](#).

Tabela 80 Podsumowanie zgodności dla fuzji RNA

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

* Przedział ufności obliczony metodą bootstrap.

Porównanie z metodą FISH w przypadku fuzji ROS1 i ALK

Dwadzieścia pięć próbek NSCLC zbadano metodą FISH pod kątem fuzji ROS1 i ALK, a 5 dodatkowych próbek NSCLC zbadano, odpowiednio, pod kątem fuzji ROS1. W przypadku ośmiu próbek metoda FISH w wypadku ROS1 nie dała rozstrzygających wyników z powodu nieodpowiedniej jakości tkanki. Dwie fuzje ROS1 i jedną fuzję ALK wykryto zarówno za pomocą TSO Comprehensive (EU), jak i FISH. Nie zaobserwowano wyników niezgodnych. [Tabela 81](#) podsumowuje wyniki zgodności TSO Comprehensive (EU) i metody FISH dla fuzji ROS1 i ALK.

Tabela 81 Podsumowanie wyniki zgodności TSO Comprehensive (EU) i metody FISH dla fuzji ROS1 i ALK

ALK+ROS1	Dodatnie uzyskane metodą FISH	Ujemne uzyskane metodą FISH
TSO Comprehensive (EU) Dodatnie	3	0
TSO Comprehensive (EU) Ujemne	0	44
Łącznie	3	44
Procent wyników zgodnych	PPA: 100% (3/3) 95% CI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95% CI: [92%, 100%]

Ważność próbki

Ważność próbki (pierwsza próba) została zmierzona dla 181 unikalnych próbek RNA i 272 unikalnych próbek DNA z bloków FFPE liczących ≤5 lat. Probki te zostały wybrane na podstawie rodzaju tkanki i dostępnego materiału; ważność testu była nieznana. Aby typ wariantu został uznany za ważny, metryki biblioteki muszą spełniać warunki kontroli jakości. Ważność próbki oceniano oddzielnie dla każdego z typów wariantów (małe

warianty DNA/TMB, MSI, amplifikacje genów, fuzje/warianty splicingowe) i przedstawiono w [Tabela 82](#).
Przewiduje się dodatkowy spadek ważności MSI o 1% dla bloków FFPE w wieku ≤ 2 lata z powodu wysyłki odczynników.

Tabela 82 Ważność próbki

Rodzaj wariantu	Ważność próbki
Fuzje/warianty splicingowe (RNA)	76%
Małe warianty DNA/TMB	75%
MSI	72%
Amplifikacja genu	94%

Podsumowanie walidacji analitycznej w zakresie profilowania nowotworu

Na podstawie danych dotyczących granicy wykrywalności, precyzji, odtwarzalności i dokładności test TSO Comprehensive (EU) został zwalidowany analitycznie pod kątem:

- Małe warianty DNA – SNV, MNV, insercje i delecje
- TMB
- MSI
- Amplifikacje genów MET i ERBB2 (HER2) (patrz [Tabela 2](#))
- 23 geny, dla których możliwe jest wykrycie fuzji (patrz [Tabela 2](#))
- Warianty splicingowe EGFR i MET (patrz [Tabela 2](#))

Wyniki kliniczne dotyczące NTRK

W celu walidacji testu TSO Comprehensive (EU) jako diagnostyki uzupełniającej (CDx) do selekcji pacjentów do leczenia produktem VITRAKVI (larotrektyrib) próbki od pacjentów włączonych do badań klinicznych nad larotrektyribem (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687 zwane dalej zbiorczo próbkami z badań nad larotrektyribem) z datą zakończenia zbierania danych 15 lipca 2019 r., uzupełnione o komercyjnie pozyskane próbki tkanek FFPE, zbadano w celu potwierdzenia wyników badania dokładności testu TSO Comprehensive (EU) oraz pomostowego badania klinicznego.

NCT02122913 było wieloośrodkowym, otwartym badaniem fazy I z eskalacją dawki u dorosłych pacjentów z zaawansowanymi guzami litymi (typu all-comers) nieselekcjonowanych pod kątem nowotworu z dodatkim statusem fuzji NTRK. Po zakończeniu części badania z eskalacją dawki rozpoczęto rozszerzanie dawki u pacjentów z udokumentowanym dodatkim statusem fuzji NTRK oraz u pacjentów, u których, zdaniem badacza, wysoce selektywny inhibitor TRK mógł przynieść korzyści. NAVIGATE NCT02576431 to trwające, wieloośrodkowe, otwarte badanie fazy II, realizowane metodą koszykową u pacjentów w wieku 12 lat

i starszych z nawracającymi zaawansowanymi guzami litymi z udokumentowaną fuzją NTRK ocenianą przez laboratorium zewnętrzne. SCOUT NCT02637687 to trwające, wieloośrodkowe, otwarte badanie fazy I/II u pacjentów pediatrycznych w wieku od urodzenia do 21 lat z zaawansowanymi guzami litymi lub pierwotnymi guzami ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Spośród pacjentów z dodatnią fuzją NTRK włączonych do badania testu TSO Comprehensive (EU) 164 utworzyło grupę służącą rozszerzonej pierwszorzędowej analizie skuteczności larotrektynybu (ePAS4).

Badanie dokładności wykrywania fuzji NTRK1, NTRK2, NTRK3

Dokładność wykrywania fuzji NTRK (NTRK1, NTRK2 lub NTRK3) w teście TSO Comprehensive (EU) u pacjentów z guzami litymi została wykazana poprzez ocenę zgodności wyników fuzji NTRK między testem TSO Comprehensive (EU) a zwalidowaną metodą ortogonalną opartą na NGS.

Przeprowadzono retrospektywne badanie nieinterwencyjne. Próbkę z badań nad larotrektynybem i próbki uzupełniające zbadano przy użyciu testu TSO Comprehensive (EU) w jednym ośrodku zewnętrznym oraz przy użyciu metody ortogonalnej w laboratorium centralnym. Dokładność rozpoznania fuzji NTRK przy użyciu testu TSO Comprehensive (EU) oszacowano w odniesieniu do metody ortogonalnej; obliczono procentową zgodność wyników dodatnich (PPA), procentową zgodność wyników ujemnych (NPA) oraz związane z nimi dwustronne 95% przedziały ufności (CI).

Zbadano 516 próbek przy użyciu testu TSO Comprehensive (EU) i/lub metody ortogonalnej. 499 spośród tych próbek zbadano obiema metodami. Siedemnastu z 516 próbek nie zbadano za pomocą jednego z testów z powodu nieudanej ekstrakcji, z nieznaną przyczyną (w przypadku metody ortogonalnej) lub odstępstwa od protokołu. Spośród 499 próbek zbadanych obiema metodami, 170 (34,1%) stanowiły próbki z badań nad larotrektynybem, a 329 (65,9%) stanowiły próbki uzupełniające.

Tabelę krzyżową wyników dla 499 próbek przedstawiono w [Tabela 83](#). Spośród 499 próbek 85 z nich miało nieprawidłowe wyniki testu TSO Comprehensive (EU); z tych 85, 53 również miało nieprawidłowe wyniki uzyskane za pomocą metody ortogonalnej. Dodatkowo siedem próbek uzyskało nieważne wyniki metodą ortogonalną. Zatem 407 z 499 próbek uzyskało ważne wyniki obiema metodami.

Tabela 83 Badanie dokładności NTRK: tabela krzyżowa wyników testu TSO Comprehensive (EU) w porównaniu z wynikami uzyskanymi metodą ortogonalną do wykrywania fuzji NTRK

Wynik uzyskane za pomocą testu TSO Comprehensive (EU)	Wyniki uzyskane za pomocą metody ortogonalnej			
	Dodatni wyniki fuzji NTRK	Ujemny wynik fuzji NTRK	Nieważne	Łącznie
Dodatni wyniki fuzji NTRK	114	16	1	131
Ujemny wynik fuzji NTRK	4	273	6	283
Nieważne*	4	28	53	85
Łącznie	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) Nieważne wyniki testu pochodzą z poziomu próbki i serii.

Analizy zgodności, z wyłączeniem i włączeniem nieprawidłowych wyników testu TSO Comprehensive (EU), przedstawiono w [Tabela 84](#). Z wyłączeniem nieprawidłowych wyników testu TSO Comprehensive (EU) PPA wyniosło 96,6% (114/118; 95% CI: 91,5–99,1), a NPA 94,5% (273/289; 95% CI: 91,2–96,8).

Tabela 84 Badanie dokładności NTRK: PPA i NPA w teście TSO Comprehensive (EU) w porównaniu z wynikami metody ortogonalnej do wykrywania fuzji NTRK

Ocena zgodności	Z wyłączeniem nieprawidłowych wyników testu TSO Comprehensive (EU)		Z włączeniem nieprawidłowych wyników testu TSO Comprehensive (EU)	
	Odsetek zgodności, % (n/N)	95% CI*	Odsetek zgodności, % (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 w oparciu o (dokładną) metodę Cloppera-Pearsona.

Pomostowe badania kliniczne mające na celu wykrywanie fuzji NTRK1, NTRK2, NTRK3

Kliniczna ważność testu TSO Comprehensive (EU) do wykrywania fuzji NTRK1, NTRK2 lub NTRK3 u pacjentów z guzami litymi, którzy mogą odnieść korzyść z leczenia larotrekty nibem, została wykazana w pomostowym badaniu klinicznym. Badanie przeprowadzono w celu oceny skuteczności klinicznej testu TSO Comprehensive (EU) do identyfikacji pacjentów z dodatnim wynikiem badania fuzji NTRK1, NTRK2 lub NTRK3 w celu poddania ich leczeniu larotrekty nibem oraz w celu oceny zgodności pomiędzy testem TSO Comprehensive (EU) a lokalnie stosowanym testem (LT) (stosowanymi do określania statusu fuzji NTRK w badaniach nad larotrekty nibem).

Metody LT obejmowały NGS, fluorescencyjną hybrydyzację in situ (FISH), reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) oraz testy NanoString. Obecność fuzji NTRK (ETV6 NTRK3) wywnioskowano u pacjentów z włóknakiomięsakami typu niemowlęcego, u których udokumentowano translokację ETV6 zidentyfikowaną metodą FISH. Większość spośród 235 pacjentów objętych badaniem z zastosowaniem larotrekty nibu, u których znany był status fuzji NTRK, przebadano metodami NGS.

Do dnia zakończenia zbierania danych, tj. 15 lipca 2019 r., do badania włączono 279 pacjentów. Spośród tych 279 pacjentów 208 wykazywało dodatni wynik w kierunku fuzji NTRK. Spośród tych 208 pacjentów z wynikiem dodatnim 164 utworzyło grupę w badaniu ePAS4 nad larotrekty nibem.

Pierwszorzędownym punktem końcowym analizy skuteczności larotrekty nibu był całkowity odsetek odpowiedzi (ORR) na podstawie oceny niezależnej komisji weryfikacyjnej (IRC) w zbiorczym zestawie danych z trzech badań klinicznych. ORR oceniono na podstawie odsetka pacjentów z najlepszą ogólną odpowiedzią w postaci potwierdzonej całkowitej odpowiedzi lub potwierdzonej częściowej odpowiedzi na podstawie wersji 1.1 kryteriów RECIST. ORR w badaniu ePAS4 dotyczącym larotrekty nibu wynosił 72,6% (95% CI [65,1%, 79,2%]) i obejmował pacjentów z 16 różnymi typami nowotworów.

Podsumowanie próbek

Zestaw próbek obejmował reprezentację szerokiego zakresu typów nowotworów oraz próbki pacjentów pediatrycznych i dorosłych.

Do dnia 15 lipca 2019 r. do badań nad larotrekty nibem włączono 279 pacjentów. Spośród nich 235 pacjentów miało znany status fuzji NTRK określony metodą LT: 208 miało status dodatni, a 27 ujemny. W przypadku 44 pacjentów status fuzji NTRK nie był znany, ponieważ badanie nie było wymagane do zakwalifikowania pacjenta do faz eskalacji dawki w badaniach NCT02122913 i SCOUT NCT02637687. Do pomostowego badania klinicznego testu TSO Comprehensive (EU) kwalifikowały się próbki pochodzące od pacjentów objętych badaniem nad larotrekty nibem, włączonych do badania do 15 lipca 2019 r., o znanym statusie fuzji NTRK (208 pacjentów z wynikiem dodatnim i 27 pacjentów z wynikiem ujemnym) oraz próbki uzupełniające, w których fuzja NTRK została określona jako ujemna za pomocą reprezentatywnych metod LT.

Spośród 208 dodatnich próbek z badania nad larotrekty nibem, 154 próbki były dostępne do badania testem TSO Comprehensive (EU). Dla 138 spośród tych próbek uzyskano ważne wyniki. Piętnaście próbek zostało unieważnionych z powodu niezadowalającej metryki jakości sekwencjonowania próbki, a 1 próbka nie została zbadana z powodu odstępstwa od protokołu. 24 spośród 27 ujemnych próbek z badania nad larotrekty nibem było dostępnych do badania. Dla 22 spośród tych próbek uzyskano ważne wyniki testu TSO Comprehensive (EU). Dwie próbki zostały unieważnione z powodu niezadowalającej metryki jakości sekwencjonowania próbki.

Próbki uzupełniające poddano badaniom przesiewowym z zastosowaniem jednej z dwóch reprezentatywnych metod LT. Uzyskano ponad 350 próbek i zbadano je pod kątem zawartości nowotworu. Spośród próbek uzupełniających spełniających wymagania dotyczące próbek, 266 poddano ekstrakcji i potwierdzono ujemny status fuzji NTRK przy użyciu reprezentatywnej metody LT. 260 spośród tych próbek było dostępnych do badania testem TSO Comprehensive (EU), a dla 222 próbek uzyskano ważne wyniki. 38 próbek zostało unieważnionych z powodu niezadowalającej metryki sekwencjonowania próbki ($n = 25$) lub niezadowalającego przebiegu sekwencjonowania ($n = 13$). Zestaw wszystkich ujemnych fuzji NTRK składał się z 222 próbek uzupełniających oraz 22 próbek z badań nad larotrekty nibem.

Wyniki zgodności

Ogółem przez TSO Comprehensive (EU) testowanych było 437 próbek. Spośród 208 pacjentów z dodatnim wynikiem fuzji NTRK 153 pacjentów miało dostępne próbki i zostali oni przebadani przez TSO Comprehensive (EU), uzyskując 138 prawidłowych i 15 nieprawidłowych wyników.

Zgodność wyników TSO Comprehensive (EU) z wynikami metod LT z uwzględnieniem i z pominięciem nieważnych wyników TSO Comprehensive (EU) przedstawiono w [Tabela 85](#).

Tabela 85 Pomostowe badanie kliniczne NTRK: Zgodność pomiędzy testem TSO Comprehensive (EU) a metodami LT w celu wykrywania fuzji NTRK

Ocena zgodności	Z wyłączeniem nieprawidłowych wyników testu TSO Comprehensive (EU)		Z włączeniem nieprawidłowych wyników testu TSO Comprehensive (EU)	
	Odsetek zgodności, % (n/N)	95% CI*	Odsetek zgodności, % (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

* Dwustronne 95% CI obliczono przy użyciu (dokładnej) metody Cloppera-Pearsona.

Analiza wrażliwości w odniesieniu do brakujących wyników testu TSO Comprehensive (EU) wykazała wiarygodność analizy zgodności. Brakujące wyniki testu TSO Comprehensive (EU) dla pacjentów z dodatnią fuzją NTRK w LT (n = 70) imputowano przy użyciu modelu regresji logistycznej. Szacunkową zgodność obejmującą wartości imputowane przedstawiono w [Tabela 86](#).

Tabela 86 Pomostowe badanie kliniczne NTRK: Zgodność pomiędzy testem TSO Comprehensive (EU) a metodami LT w wykrywaniu fuzji NTRK, z uwzględnieniem wartości imputowanych dla pacjentów z dodatnim wynikiem w LT i z brakującymi wynikami testu TSO Comprehensive (EU)

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

Brakujące wyniki testu TSO Comprehensive (EU) dla pacjentów z ujemną fuzją w LT nie były imputowane.

* Dwustronne 95% CI zostały obliczone na podstawie metody Boot z wielokrotną imputacją. Metoda Boot z wielokrotną imputacją jest metodą typu bootstrap zagnieżdżoną w wielokrotnej imputacji (Schomaker and Heumann 2018).

Zgodność pomiędzy testem TSO Comprehensive (EU) i metodami LT według typu metody (np. RNA NGS, FISH) przedstawiono w [Tabela 87](#).

Tabela 87 Pomostowe badanie kliniczne NTRK: Zgodność pomiędzy testem TSO Comprehensive (EU) a metodami LT w celu wykrywania fuzji NTRK według typu metody LT

Typ metody LT	Ocena zgodności	Odsetek zgodności, % (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)

Typ metody LT	Ocena zgodności	Odsetek zgodności, % (n/N)	95% CI ¹
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	Nie obliczono (1/1)	Nie obliczono
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Nie obliczono (0/0)	Nie obliczono
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Nie obliczono: dla podgrup, w których liczba próbek wynosiła <5, nie obliczono statystyk zgodności.

¹ Dwustronne 95% CI obliczono przy użyciu (dokładnej) metody Cloppera-Pearsona.

² Obejmuje metody NGS wykorzystujące wyłącznie RNA oraz zarówno DNA, jak i RNA.

Spośród 437 próbek przebadanych testem TSO Comprehensive (EU), 24 miały wyniki rozbieżne z LT: 15 było dodatnich w LT i ujemnych w teście TSO Comprehensive (EU), a 9 było ujemnych w LT i dodatnich w teście TSO Comprehensive (EU). Spośród 24 próbek z rozbieżnymi wynikami, 8 zbadano metodą LT DNA NGS, 14 metodą LT RNA NGS, a 2 metodą FISH.

Zwalidowana niezależna metoda NGS potwierdziła wyniki testu TSO Comprehensive (EU) dla 14 z 24 próbek z rozbieżnymi wynikami. W przypadku pozostałych 10 próbek wyniki testu TSO Comprehensive (EU) były rozbieżne zarówno z LT, jak i z niezależną metodą NGS.

Ocena skuteczności klinicznej

W ramach badania kohorty ePAS4 skuteczność larotrektylibu w populacji z dodatnim wynikiem TSO Comprehensive (EU) i dodatnim wynikiem LT (97 pacjentów, ORR = 78,4%, 95% CI [68,8%, 86,1%]) była podobna do skuteczności larotrektylibu w całej populacji ePAS4 (164 pacjentów, ORR = 72,6%, 95% CI [65,1%, 79,2%]) ([Tabela 88](#)). Spośród 97 pacjentów z dodatnim wynikiem TSO Comprehensive (EU) w badaniu ePAS4 28 (28,9%) pacjentów uzyskało całkowitą odpowiedź/ całkowitą odpowiedź po zabiegu chirurgicznym, a 48 (49,5%) pacjentów uzyskało częściową odpowiedź.

Spośród 13 pacjentów z ujemnym wynikiem TSO Comprehensive (EU) i dodatnim wynikiem LT, 1 (7,7%) wykazywał całkowitą odpowiedź, a 2 (15,4%) wykazywało częściową odpowiedź na leczenie larotrektylibem.

Tabela 88 Pomostowe badanie kliniczne NTRK: ORR dla pacjentów z dodatnim wynikiem LT wg wyników LT i TSO Comprehensive (EU) w ePAS4

		Dodatni wynik w kierunku fuzji za pomocą LT N = 164	TSO Comprehensive (EU) Dodatni i dodatni wynik LT N = 97	TSO Comprehensive (EU) Ujemny i dodatni wynik LT N = 13
Najlepsza ogólna odpowiedź, n (%)	Całkowita odpowiedź	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Całkowita odpowiedź po leczeniu chirurgicznym	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Częściowa odpowiedź	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabilizacja choroby	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progresja choroby	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Nieemożliwy do oceny	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Całkowity odsetek odpowiedzi	Liczba pacjentów, n	164	97	13
	Liczba pacjentów z 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)

Skróty: CR = całkowita odpowiedź, PR = częściowa odpowiedź, sCR = całkowita odpowiedź po leczeniu chirurgicznym.

* Dwustronny 95% przedział ufności obliczono przy użyciu (dokładnej) metody Cloppera-Pearsona.

U 54 pacjentów brakuje wyników testu TSO Comprehensive (EU).

Dane z tego badania potwierdzają bezpieczeństwo i skuteczność testu TSO Comprehensive (EU) stosowanego do identyfikacji pacjentów z guzami litymi z fuzją NTRK, którzy mogą kwalifikować się do leczenia larotrekty nibem.

Piśmiennictwo

1. American Society of Clinical Oncology (Amerykańskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej). www.asco.org.
Dostęp: 3 października 2016 r.
2. European Society for Medical Oncology (Europejskie Towarzystwo Onkologii Klinicznej). www.esmo.org.
Dostęp: 3 października 2016 r.

Historia wersji

Wersja	Data	Opis zmian
Nr dokumentu: 200007789, wer. 08	Maj 2025 r.	Usunięto odniesienie do wersji oprogramowania i numerów części. Zaktualizowane ograniczenia procedury: • Informacje dotyczące tkanki martwiczej • Informacje dotyczące odsetka komórek nowotworowych MSI. Zaktualizowano: • Przypis NTC do zastosowania zarówno w bibliotece min., jak i maks. • Listę sprzętu i materiałów zawierającą specyfikacje wirówki płytkowej i przyrosty pipety • Obliczenie nadwyżki SPB od 1,05x do 1,15x • Terminologię MET exonu 14 del do MET exonu 14 skipping. Dodano: • Uwagę do SMB w przypadku celów pierwszego i drugiego wychwytywania sekwencji docelowych • Przygotowanie do wprowadzenia sekwencjonowania • Dodatkowe informacje dotyczące homogenizatora ultradźwiękowego Dodano wyjaśnienia i zaktualizowane wyniki dotyczące charakterystyki działania: • Substancje zakłócające • Dokładność profilowania guza i ważność próbki • Badanie granicy wykrywalności 1 i 2 • Badanie 1 – precyzja wewnątrzlaboratoryjna • Badanie odtwarzalności 2 • Stabilność biblioteki i informacje o przechowywaniu biblioteki • Granica próby ślepej Zaktualizowano język i gramatykę.

Wersja	Data	Opis zmian
Nr dokumentu: 200007789, wer. 07	Styczeń 2024 r.	• Dodano informacje do ograniczeń dotyczących procedury: • Wymagania dotyczące zawartości tkanki martwiczej i komórek nowotworowych w próbce do analizy MSI-high i somatycznych mutacji kierujących • Potencjalne zakłócenia powodowane przez wpływ hemoglobiny • Granice wykrywalności w genie RET i rozpoznania fuzji poza granicami opisywanego genu • Delecje genów nie są zgłaszane • Aktualizacja do stosowania z oprogramowaniem TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager w wersji 2.3.7. • Dodano informacje dotyczące wymaganego, ale niedostarczonego sprzętu i materiałów, w tym dwóch dodatkowych konfiguracji homogenizatora ultradźwiękowego. • Zaktualizowano informacje o próbce: • Zawartość tkanki martwiczej • Wpływ proteiny K i hemoglobiny • Przechowywanie FFPE na szkiełku i oczyszczonego kwasu nukleinowego. • Dodano informacje w celu poprawy obsługi odczynników, procedury i rozwiązywania problemów w przypadku awarii kontroli jakości podczas przebiegu. • Dodano kontekst i przejrzystość do charakterystyki wydajności: • Zanieczyszczenie krzyżowe • Ocena zestawów do ekstrakcji kwasów nukleinowych • Substancje zakłócające • Stabilność kwasu nukleinowego i FFPE na szkiełku • Wyniki kliniczne dotyczące NTRK. • Zaktualizowano język i gramatykę.
Nr dok.: 200007789, wer. 06	Luty 2023 r.	• Dodatkowe oświadczenia w sekcji Ograniczenia • Poprawki językowe dla zachowania konwencji oraz poprawy gramatyki i przejrzystości • Korekta tabel 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Oświadczenie dotyczące obecności osadów w odczynniku FSM • Zaktualizowane specyfikacje termocyklera i minimalnych parametrów na liście Sprzęt i materiały

Wersja	Data	Opis zmian
Nr dokumentu: 200007789, wer. 05	Wrzesień 2022 r.	Zaktualizowano 2 tabele odtwarzalności dla badania.
Nr dokumentu: 200007789, wer. 04	Czerwiec 2022 r.	• Dodano numery kat. wersji 2.3.5 modułu analitycznego TSO Comprehensive • Usunięto numery kat. wersji 2.3.3 modułu analitycznego TSO Comprehensive • Zaktualizowano terminologię w sekcji Granica próby ślepej
Nr dok.: 200007789, wer. 03	Kwiecień 2022 r.	• Dodano informacje dotyczące charakterystyki wydajności w zakresie fuzji genów NTRK • Dodano oznaczenie TYLKO NA EKSPORT • Zaktualizowano oświadczenie o przewidzianym zastosowaniu w celu dodania diagnostyki uzupełniającej genów NTRK1-3 • Rozszerzono informacje o elementach produktu, aby uwzględnić numery części składników oprogramowania
Nr dok.: 200007789, wer. 02	Luty 2022 r.	• Skorygowano błędne odniesienie do tabeli • Dodano ograniczenie związane z wariantami linii germinalnej i somatycznej • Uproszczono treść dotyczącą wykrywania amplifikowanego genu
Nr dok. 200007789 wer. 01	Grudzień 2021 r.	• Zaktualizowano ograniczenia dotyczące procedury • Objasniono specyfikacje statywu magnetycznego i termocyklera na listach sprzętu i materiałów
Nr dok.: 200007789, wer. 00	Listopad 2021 r.	Pierwsze wydanie

Patenty i znaki towarowe

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc., a także jej podmiotów zależnych („Illumina”), i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane w innych celach i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych, praw autorskich lub prawa wynajazdowego, ani podobnych praw osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2025 r. Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć pod adresem www.illumina.com/company/legal.html.

Dane do kontaktu



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Etykiety produktu

Objaśnienia symboli zamieszczonych na opakowaniu i samym produkcie znajdują się w legendzie symboli dostępnej na stronie support.illumina.com, na karcie *Documentation* (Dokumentacja) danego zestawu.