

TruSight Oncology Comprehensive (UE)

Prospect

A SE UTILIZA LA DIAGNOSTICAREA IN VITRO. NUMAI PENTRU EXPORT.

Utilizarea preconizată

TruSight™ Oncology Comprehensive (UE) este un test de diagnostic *in vitro* care utilizează secvențierea țintită de ultimă generație pentru detectarea de variante în 517 gene, pe bază de acizi nucleici extrași din specimene de țesut tumoral fixat cu formalină și încorporat în parafină (FFPE), obținute de la pacienți cu neoplasme maligne de organe pline, cu instrumentul Illumina® NextSeq™ 550Dx. Testul poate fi utilizat pentru detectarea de variante mononucleotidice și multinucleotidice, de inserții, deleții și amplificări de gene din ADN, precum și de variante de gene cu fuziuni și splice din ARN. Testul raportează și statusul pentru încărcarea mutațională tumorală (TMB) și instabilitatea microsatelitară (MSI).

Utilizarea preconizată a testului este pentru diagnostic corelat, în identificarea de pacienți cu cancer pentru tratament ținut cu produsele terapeutice enumerate în [Tabelul 1](#), conform etichetei terapeutice aprobate a produselor. De asemenea, testul este preconizat pentru informații pentru analiza profilului tumoral, utilizabile de cadre medicale calificate în conformitate cu ghidurile profesionale, neputând fi, totodată, utilizat pentru a decide sau prescrie utilizarea aprobată a vreunui produs terapeutic.

Tabelul 1 Indicație de diagnostic corelat

Tip de tumoare	Biomarkeri	Terapie țintită
Tumori de organe pline	Fuziuni genice NTRK1, NTRK2 și NTRK3	VITRAKVI® (larotrectinib)

Rezumatul și explicarea testului

Descriere clinică

Cancerul este principala cauză de deces la nivel mondial și poate proveni din orice țesut.^{1, 2} Analiza bazei genetice a cancerului este importantă pentru a identifica pacienții care pot beneficia de terapii direcționate și pentru a dezvolta noi metode de tratament. În cauzele sau progresia cancerului pot fi implicate numeroase gene și multe cancere poartă o varietate de variante care afectează aceste gene și funcțiile lor. Aceste variante pot include mutații genetice de tipul variantelor mononucleotidice (SNV), multinucleotidice (MNV), al inserțiilor sau delețiilor, al amplificărilor și fuziunilor de gene și al variantelor cu splice. O altă consecință a mutațiilor genice ale cancerului este prezentarea de neoantigeni care provoacă răspunsuri imune specifice cancerului. Starea mutațională a unei tumori poate fi reprezentată de TMB și MSI, care sunt semnături genomice asociate cu instabilitate genomică și prezentarea de neoantigeni tumoralii.

TruSight Oncology Comprehensive este un test calitativ detaliat de analiză a profilului genomic (CGP) prin secvențiere de ultimă generație (NGS) care evaluează variantele genomice ale unui grup vast de gene asociate cancerului, enumerate în [Tabelul 2](#). Analiza detectează mici variante în 517 gene, plus amplificări genice, fuziuni genice și variante splice, astfel cum este indicat în [Tabelul 2](#). Analiza asigură acoperirea secvențelor de codificare pentru toate genele, cu excepția TERT, în care este acoperită doar zona promotoare, evaluând, totodată, scorul TMB și statusul MSI. Aceste ținte de testare includ conținutul citat de organizații profesionale și alte linii directoare majore din SUA. Publicațiile consorțiilor independente și cercetările farmaceutice în stadiu avansat au influențat, de asemenea, designul testului TSO Comprehensive.

Pentru o listă a zonelor excluse din definirea de variante, consultați *TruSight Oncology Comprehensive Lista de blocare* (nr. document 200009524), disponibilă pe [site-ul de asistență](#) Illumina.

În [Tabelul 2](#) sunt identificate patru categorii de tipuri de variante: Variantă ADN scurtă (S), amplificare a genelor (A), fuziune (F) și variantă splice (Sp). Variantele ADN scurte includ SNV, MNV, inserțiile și delețiile.

Tabelul 2 TSO Comprehensive (UE) Panou gene analiză

Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
(26)	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S

Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă
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
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63 ¹	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S

Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă
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 ⁵	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	INH1A	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	Set	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270 ¹⁷	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S

Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă
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 ⁶	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 ¹⁸	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 ¹⁹	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	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

Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă	Nr.	Introducere ID	Genă	Tip de variantă
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 ¹⁴	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	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică

Principiile procedurii

Testul TSO Comprehensive (UE) este un test distribuit efectuat manual cu ajutorul acidului nucleic extras ca material inițial. Pentru pregătirea bibliotecilor se utilizează ADN și/sau ARN extrase din țesut fixat cu formalină și încorporat în parafină (FFPE), care sunt apoi îmbogățite pentru genele-conexe cancerului și secvențiate cu Instrumentul NextSeq 550Dx.

TSO Comprehensive (UE) Analiza implică următoarele procese.

- **Prepararea și concentrarea bibliotecii** – pentru ARN, 40 ng ARN în total se convertesc în ADN complementar cu catenă dublă (cADN). Pentru ADN genomic (gDNA), 40 ng de ADN gADN se fragmentează mecanic în fragmente scurte. Adaptorii de secvențiere sunt ligați de fragmentele de cADN și gADN. Secvențele adaptoarelor P5 și P7 sunt încorporate în fiecare bibliotecă pentru a permite captarea de fragmente de bibliotecă pe suprafața celulei de flux în timpul secvențierii. Adaptoarele includ secvențele de indexare i5 și i7 pentru identificarea fiecărui specimen individual și, în cazul bibliotecilor din specimene de gADN, molecule individuale prin utilizarea de identificatori moleculari unici (UMI). Bibliotecile sunt apoi concentrate pentru genele de interes specifice cu o metodă pe bază de captare. Secvențele sondă biotinite din zonele de interes ale genei țintite de analiză sunt hibridizate în biblioteci. Sondele și bibliotecile țintite hibridizate sunt izolate de bibliotecile nețintite prin captare cu particule magnetice cu streptavidin. Bibliotecile țintite concentrate sunt spălate și amplificate. Cantitatea fiecărei biblioteci concentrate este apoi normalizată cu o metodă cu bile, pentru a asigura reprezentarea egală pentru secvențiere în bibliotecile grupate.
- **Secvențiere și analiză primară** – Bibliotecile normalizate și concentrate sunt grupate cu formare de clustere într-o celulă flow cell, iar apoi secvențiate prin reacție chimică de sinteză (SBS) pe NextSeq 550Dx. Reacția chimică SBS folosește o metodă cu terminator reversibil pentru a detecta bazele deoxinucleotidice trifosfat (dNTP) etichetate fluorescent, pe măsură ce acestea sunt încorporate în catenele de ADN în creștere. În fiecare ciclu de secvențiere se adaugă la lanțul acidului nucleic o singură dNTP. Eticheta dNTP acționează ca terminator pentru polimerizare. După fiecare incorporare de dNTP, se analizează imagistic colorantul fluorescent pentru identificarea bazei, acesta fiind apoi clivat pentru a permite incorporarea următoarei nucleotide. Patru dNTP reversibile fixate cu terminator (A, G, T și C) sunt prezente ca molecule unice, separate. Prin urmare, competiția naturală minimizează deviația de incorporare. În analiza primară, definirea de baze se efectuează direct pe baza măsurării intensității semnalului în fiecare ciclu de secvențiere, efectuându-se, astfel, secvențierea bază-cu-bază. Fiecărei definiri de baze i se atribuie un scor de calitate.
- **Analiză secundară** – Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE) se află pe instrumentul NextSeq 550Dx ca parte a software-ului Local Run Manager, pentru a facilita configurarea ciclului TSO Comprehensive (UE) și pentru a efectua analiza secundară a rezultatelor de secvențiere. Analiza secundară include validarea procesării ciclului și controlul calității, urmate de demultiplexare, generarea de fișiere FASTQ, aliniere și definirea de variante. Demultiplexarea separă datele din bibliotecile grupate pe baza indecșilor de secvențiere unici adăugați în procedura de pregătire a bibliotecii. Se generează fișierele FASTQ, care conțin citirile de secvențiere pentru fiecare specimen și scorurile de calitate, exceptând citirile din toate clusterelor care nu au corespuns filtrului. Citirile de secvențiere sunt aliniate apoi la un genom de referință, pentru identificarea relațiilor dintre secvențe și li se

alocă un scor bazat pe zonele similare. Citirile aliniate sunt scrise în fișiere în format BAM. Software-ul de analiză utilizează algoritmi separați pentru bibliotecile generate din specimene de ADN și/sau ARN pentru definirea de variante de ADN scurte, amplificări de gene, TMB și MSI pentru specimene de ADN și variante fuzionate și cu splice de specimene ARN. Modulul software de analiză generează multiple rezultate, incluzând valorile de secvențiere și fișierele în format Variant Call Format (VCF). Fișierele VCF conțin informații despre variantele situate în poziții specifice într-un genom de referință. Se generează pentru fiecare specimen valorile de secvențiere și fișierele individuale cu rezultate. Pentru detalii privind analiza secundară și terțiară, consultați *Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE)* (nr. document 200008661).

- **Analiza terțiară** – Analiza terțiară, efectuată de Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE), se compune din calcularea TMB și MSI, determinarea diagnosticului corelat, analiza profilului tumoral pe baza variantelor la două niveluri de relevanță clinică pe baza fondului de cunoștințe (Knowledge Base/KB) și a tipul de țesut, precum și generarea raportului rezultatelor. Analiza profilului tumorii poate fi denumită și analiză completă a profilului genomic. Rezultatele interpretate privind variantele și rezultatele biomarkerilor TMB și MSI sunt rezumate în raportul rezultatelor TSO Comprehensive (UE).

Limitările procedurii

Exclusiv pentru diagnosticarea *in vitro*.

- Pentru utilizare numai pe bază de prescripție medicală. Este obligatorie utilizarea testului conform reglementărilor clinice de laborator.
- Rezultatele genomice enumerate în [Tabelul 2](#) pentru utilizarea preconizată nu reprezintă indicații ori concluzii în sprijinul utilizării aprobate pentru niciun produs terapeutic specific.
- Pentru variantele enumerate în raportul rezultatelor TSO Comprehensive (UE), la capitolul Rezultate genomice cu relevanță clinică dovedită (Nivel 2) și Rezultate genomice cu potențială relevanță clinică (Nivel 3) nu s-a efectuat validare clinică.
- Deciziile de îngrijire medicală și tratament pentru pacienți trebuie să se bazeze pe raționamentul clinic al medicului curant, ținându-se seama de toate informațiile aplicabile relative la afecțiunea pacientului, cum sunt antecedentele familiale și examinările fizice ale pacientului, informațiile din alte teste de diagnosticare și preferințele pacientului conform standardului de îngrijire medicală din respectiva comunitate.
- Calitatea specimenelor FFPE variază semnificativ. E posibil ca speciemenele cărora nu li s-au aplicat proceduri de fixare standard să nu genereze acizi nucleici care să respecte cerințele de control al calității ale testului ([Controlul calității la pagina 81](#)). Blocurile FFPE depozitate mai mult de cinci ani prezintă validitate mai redusă demonstrată.
- Nu s-au evaluat performanțele TSO Comprehensive (UE) cu specimene de la pacienți cu transplant de organe sau țesuturi.
- O cantitate ridicată de țesut necrotic ($\geq 23\%$) poate interfera cu capacitatea testului TSO Comprehensive (UE) de a detecta amplificări de gene și fuziuni ARN.

- Mutațiile somatice conducătoare nu pot fi detectate cu siguranță dacă conținutul tumoral (după zonă) este mai mic de 20%.
- Un rezultat al stabilului cu microsatelit (MS-stabil) poate fi nesigur dacă conținutul tumoral este mai mic de 30%. Un rezultat ridicat de microsatelit (MSI-ridicat) este corect, indiferent de conținutul tumoral.
- Hemoglobina asociată cu țesutul scade valorile de susținere obținute pentru variantele splice MET.
- În genomuri cu rearanjare substanțială, cu deleții și dispariție a heterozigotismului, software-ul TSO Comprehensive (UE) poate clasifica eronat un specimen ADN ca fiind contaminat (CONTAMINATION_SCORE > 3106 și valoare $p > 0,049$).
- Un rezultat negativ nu exclude prezența unei mutații sub limita de detecție (LoD) a testului.
- Sensibilitatea în detecția variantelor ADN scurte poate fi afectată de:
 - Contextul genomic de complexitate redusă.
 - Lungime crescătoare a variantelor.
- Scorurile TMB pot fi imprecise în următoarele contexte:
 - Dacă conținutul tumorii este la niveluri unde frecvențele alelelor variantelor gametice și somatice (VAF) converg.
 - În populații nereprezentate suficient în bazele de date publice.
- Amplificările genelor sunt singurele variante de numere de copii raportate de TSO Comprehensive (UE). Delețiile genelor nu sunt raportate de analiză.
- Algoritmii de definire a fuziunii din software-ul de analiză TSO Comprehensive (UE) pot să nu ia în considerare dovezi din valori de citire care se extind în afara limitelor genelor adnotate.
- Sensibilitatea în detecția fuziunilor poate fi afectată de:
 - Complexitatea redusă a bibliotecilor, conducând la un număr scăzut de citiri de susținere din cauza deviațiilor din fluxul de lucru de analiză (de exemplu, respectarea pașilor de mixare din [Denaturare și renaturare ARN la pagina 44](#)).
 - O genă unică care acoperă ambele puncte de întrerupere.
 - Mai multe puncte de întrerupere pentru fuziuni se află în imediată proximitate unele față de altele la parteneri multipli; e posibil ca multiplele puncte de întrerupere și multiplii parteneri să se raporteze ca punct de întrerupere și partener unic.
 - După dimensiunile reduse ale inserției mediene. Este obligatorie o dimensiune minimă a inserției mediene de 80 bp, dar sensibilitatea scade în intervalul 80-100 bp.
 - După complexitatea redusă a secvențierii sau contextul genomic omolog conex punctelor de întrerupere pentru fuziuni.
- Rezoluția genelor implicate într-o fuziune poate fi afectată în cazul în care punctele de întrerupere apar în zone genomice cu gene suprapuse. Testul va raporta toate genele, delimitate cu „,”, dacă la punctul de întrerupere se suprapun multiple gene.
- Acoperirea inconsecventă în zona promotoare TERT poate duce la No Result (fără rezultate), din cauza profunzimii reduse.

- Adnotările sau erorile KB pot duce la rezultate fals pozitive sau fals negative, incluzând includerea unei variante la nivelul greșit (din Rezultate genomice cu relevanță clinică dovedită (Nivel 2) și Rezultate genomice cu potențială relevanță clinică (Nivel 3) sau informațiile de adnotare din raport pot fi incorecte. Variantele raportate în Rezultatele pentru CDx nu sunt afectate de erorile de adnotare sau KB. Există următoarele trei potențiale surse de erori:
 - Adnotare variantă TSO Comprehensive (UE). Există o rată de eroare de cca. 0,0027%, bazată pe analiza a 2.448.350 de variante din COSMIC v92, existând, așadar, potențial de erori redus.
 - Erori KB cauzate de procesul de specificare.
 - Relevanța conținutului din KB se modifică în timp. Raportul reflectă cunoștințele de la momentul autentificării și verificării KB.
- TSO Comprehensive (UE) a fost conceput pentru raportarea variantelor somatice cu relevanță clinică sau cu potențială relevanță clinică. Ca test exclusiv tumoral, raportarea variantelor liniei germinale (moștenite) este posibilă, dar neintenționată. TSO Comprehensive (UE) utilizează un KB pentru a raporta variante fără a adnota explicit, dacă acestea au origine germinală sau somatică.
- KB include doar asocieri de natură terapeutică, de diagnostic și de prognostic relevante pentru variantele prezente în neoplasme maligne de organe pline cunoscute. Suspiciunile și asocierile cu risc de cancer nu sunt incluse în KB.
- Tabelul următor afișează modificările nucleotidelor pentru trei variante RET pe care analiza nu le poate detecta. Pot fi detectate și alte modificări ale nucleotidelor pentru aceeași modificare a aminoacizilor.

Tabelul 3 Modificări ale nucleotidelor pentru trei variante RET

Modificare a aminoacizilor	Chr*	Poziție	alelă de referință	Alternativă
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCCG TGCGGCCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

* Chr = cromozom

Componentele produsului

Testul TSO Comprehensive (UE) este alcătuit din următoarele componente:

- Kitul TruSight Oncology Comprehensive (UE) (Illumina nr. catalog 20063092) - Kitul include reactivi cu volum suficient pentru a genera 24 de biblioteci ADN și 24 de biblioteci ARN. Acest volum include specimene de la pacienți și controale. Controalele sunt comercializate separat (consultați [Reactivi obligatorii, nefurnizați la pagina 17](#)).
- Knowledge Base: actualizat lunar și disponibil pentru descărcare din portalul Illumina Lighthouse.
- Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE) (Illumina nr. catalog 20051843), care include următoarele componente:
 - TSO Comprehensive Pachete de ipoteze
 - TSO Comprehensive Suită software
 - TSO Comprehensive Kit USB

Un reprezentant de service Illumina instalează versiunea corespunzătoare a Modul de analiză TSO Comprehensive (UE) pe Local Run Manager Instrumentul NextSeq 550Dx. Pentru informații despre modulul de analiză, consultați Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200008661).

Reactivi

Reactivi furnizați

Următorii reactivi sunt furnizați împreună cu kitul TSO Comprehensive (UE).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
First strand synthesis mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Soluție apoasă tamponată cu săruri și nucleotide	între -25 °C și -15 °C
Second strand mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Soluție apoasă tamponată cu săruri, DNA polymerase (polimerază ADN), ARNază H și nucleotide	între -25 °C și -15 °C

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Soluție apoasă tamponată cu săruri și hexameri aleatorii	între -25 °C și -15 °C
Reverse transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Soluție apoasă tamponată cu reverse transcriptase (transcriptază inversă)	între -25 °C și -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Congelare), PN 20031118

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Soluție apoasă tamponată cu DNA polymerase (polimerază ADN) T4 și kinază polinucleotidică	între -25 °C și -15 °C
End repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Soluție apoasă tamponată cu săruri și nucleotide	între -25 °C și -15 °C
Adapter ligation buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Soluție apoasă tamponată care conține săruri	între -25 °C și -15 °C
DNA ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Soluție apoasă tamponată cu ligază	între -25 °C și -15 °C
Short universal adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Soluție apoasă tamponată cu oligonucleotide de secvențiere universale	între -25 °C și -15 °C

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
UMI adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Soluție apoasă tamponată cu oligonucleotide de secvențiere universale	între -25 °C și -15 °C
Stop ligation buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Soluție apoasă tamponată care conține săruri	între -25 °C și -15 °C
Enhanced PCR mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Soluție apoasă tamponată cu DNA polymerase (polimerază ADN) și nucleotide	între -25 °C și -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (refrigerat), PN 20031119

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Resuspension buffer	20031444	1	12,4 ml	Soluție apoasă tamponată care conține săruri	între 2 °C și 8 °C
Sample purification beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Soluție apoasă cu bile magnetice	între 2 °C și 8 °C
TE buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Soluție EDTA tris	între 2 °C și 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

Ingrediente active: Soluție apoasă tamponată cu primeri cu oligonucleotide cu cod de bare.

**ATENȚIE**

Utilizați primeri unici de indexare (UPxx) pentru specimene ARN sau ADN. Nu combinați primerii de indexare CPxx și UPxx în aceeași bibliotecă.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Ingrediente active: Soluție apoasă tamponată cu primeri cu oligonucleotide cu cod de bare.

**ATENȚIE**

Utilizați primeri de indexare combinatorică (Cp_{xx}) doar pentru specimene ADN. Nu combinați primerii de indexare CP_{xx} și UP_{xx} în aceeași bibliotecă.

Primer de indexare	Număr componentă	Cantitate	Volum	Index i7	Secvențiere	Index i5	Secvențiere	Temperatură de depozitare
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	între -25 °C și -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	între -25 °C și -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	între -25 °C și -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	între -25 °C și -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	între -25 °C și -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	între -25 °C și -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	între -25 °C și -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	între -25 °C și -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	între -25 °C și -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	între -25 °C și -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	între -25 °C și -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	între -25 °C și -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	între -25 °C și -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	între -25 °C și -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	între -25 °C și -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	între -25 °C și -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerat), PN 20031123

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Target capture buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Soluție apoasă tamponată cu formamidă și săruri	între 2 °C și 8 °C
Streptavidin mag beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Soluție apoasă tamponată cu săruri și bile paramagnetice în fază solidă, cu acoperire covalentă cu streptavidin	între 2 °C și 8 °C

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Soluție de hidroxid de sodiu	între 2 °C și 8 °C
Elute target buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Soluție apoasă tamponată	între 2 °C și 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Bile paramagnetice în fază solidă în soluție apoasă tamponată	între 2 °C și 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Soluție apoasă tamponată care conține săruri, 2-Mercaptoethanol și formamidă	între 2 °C și 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Soluție apoasă tamponată care conține săruri	între 2 °C și 8 °C
Resuspension buffer	20031444	1	12,4 ml	Soluție apoasă tamponată care conține săruri	între 2 °C și 8 °C
Sample purification beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Soluție apoasă cu bile magnetice	între 2 °C și 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (congelat), PN 20031121

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Soluție apoasă tamponată cu oligonucleotide	între -25 °C și -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Soluție apoasă tamponată care conține săruri	între -25 °C și -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Soluție apoasă tamponată cu detergent	între -25 °C și -15 °C

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Enhanced PCR mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Soluție apoasă tamponată cu DNA polymerase (polimerază ADN) și nucleotide	între -25 °C și -15 °C
PCR primer cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Soluție apoasă tamponată cu primeri P5 și P7	între -25 °C și -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4.6 ml	Soluție apoasă tamponată care conține săruri, 2- Mercaptoetanol și formamidă	între -25 °C și -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 or PhiX)	20031492	1	10 µl	Soluție apoasă tamponată cu ADN genomic PhiX	între -25 °C și -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reactiv	Număr componentă	Cantitate	Volum	Ingrediente active	Temperatură de depozitare
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Sondă pentru grupuri de oligonucleotide	între -25 °C și -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Sondă pentru grupuri de oligonucleotide	între -25 °C și -15 °C

Reactivi obligatorii, nefurnizați

Reactivi pentru preamplificare

- DNA and RNA extraction and purification reagents (Reactivi pentru purificarea și extracția ADN și ARN) – Pentru cerințele privind reactivii, consultați [Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28](#).
- DNA and RNA quantification reagents (Reactivi pentru cuantificarea ADN și ARN) - Pentru cerințele privind reactivii, consultați [Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28](#).
- TruSight Oncology Controale:

- TruSight Oncology DNA Control (Illumina nr. de catalog 20065041)
- TruSight Oncology RNA Control (Illumina nr. de catalog 20065042)
- Ethanol (EtOH), 100% (200 proof), adecvat pentru biologie moleculară.
- RNase/DNase-free water

Reactivi pentru postamplificare

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cicluri) (Illumina nr. de catalog 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cicluri)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cicluri)
- Etanol, 100% (200 proof), adecvat pentru biologie moleculară
- RNase/DNase-free water

Depozitarea și manipularea reactivilor

Următoarele cutii de reactivi sunt expediate congelate. Depozitați la temperaturi între -25 °C și -15 °C.

Cutie	Număr componentă	Zona din laborator
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Library Prep (congealați)	20031118	Pre-amp
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pre-amp
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Enrichment (congealați)	20031121	Post-amp
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Post-amp



ATENȚIE

Nu depozitați reactivii într-o unitate fără-gheață sau în compartimentele de pe ușile frigiderelor.

Următoarele cutii de reactivi sunt livrate împreună cu pungi cu gel pentru menținere la temperaturi între 0 °C și 10 °C. Depozitați la temperaturi între 2 °C și 8 °C.

Cutie	Număr componentă	Zona din laborator
TruSight Oncology Comp Library Prep (refrigerați)	20031119	Pre-amp
TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerați)	20031123	Post-amp



ATENȚIE

Nu congelați reactivii care conțin bile (LNB1, SPB și SMB).

- Modificările aspectului fizic al reactivilor pot indica deteriorarea materialelor. Dacă apar modificări ale aspectului reactivilor (de exemplu, schimbarea culorii sau turbiditatea reactivilor), nu-i utilizați.
- FSM, SSM, ERA1-B și TCB1 pot conține particule legate de produs. Urmăți instrucțiunile de manipulare specifice pentru fiecare reactiv. După efectuarea pașilor de mixare a FSM și SSM, particulele albe rămase nu vor afecta performanța.
- Stabilitatea testului TSO Comprehensive (UE) a fost evaluată, fiindu-i evaluate și demonstrate performanțele pentru până la patru utilizări ale kiturilor. Reactivii sunt stabili dacă sunt depozitați la temperaturile indicate, până la data de valabilitate specificată pe eticheta cutiei.

Echipamente și materiale

Echipamentele și materialele necesare, nefurnizate

Echipamente și materiale preamplificare

Echipament	Furnizor
Baie cu ultrasunete, cu accesoriile aferente Consultați Setările de configurare a băii cu ultrasunete pentru fragmentarea ADN-ului la pagina 23.	Furnizor general pentru laboratoare
Ciclor termic cu următoarele specificații: • Capac încălzit, reglabil la 30 °C și 100 °C (sau cu posibilitate de oprire, dacă nu poate ajunge la 30 °C) • Operează în intervalul de temperatură 4 °C-99 °C • Precizia temperaturii ±0,25 °C • Compatibilitate cu plăci PCR cu 96 godeuri, 0,2 ml • Consultați Rata de creștere a temperaturii pentru ciclorul termic la pagina 26	Furnizor general pentru laboratoare

Echipament	Furnizor
Agitator	Furnizor general pentru laboratoare
Incubatoare de microspecimene (2) cu insert pentru plăci MIDI cu 96 godeuri (2)	Furnizor general pentru laboratoare
Microcentrifugă	Furnizor general pentru laboratoare
Placă centrifugă cu următoarele specificații: • Compatibil cu microplăci cu 96 de godeuri • Putere de centrifugare 280 × g (+/- 10%)	Furnizor general pentru laboratoare
Placă vibratoare cu următoarele specificații: • Orbită de 2 mm • Turație de agitare 1200 rpm și 1800 rpm	Furnizor general pentru laboratoare
Pană sau rolă de sigilare	Furnizor general pentru laboratoare
Suport magnetic cu următoarele specificații: • Conceput pentru precipitare/separare cu bile paramagnetice • Magneți pe laterala suportului (nu pe fund) • Compatibil cu plăci MIDI cu 96 de godeuri	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete de precizie capabile să livreze cu precizie volume între 2 µl și 1000 µl, cu următoarele specificații: • Pipetă cu un singur canal sau multicanal cu increment de 0,02 ml • Pipetă cu un singur canal sau multicanal cu increment de 0,1 µl, 0,2 µl sau 0,5 µl • Pipetă cu un singur canal sau multicanal cu increment de 1 µl sau 2 µl Pipetele trebuie calibrate regulat și precis în interval de 5% din volumul indicat.	Furnizor general pentru laboratoare
Dispozitiv pentru pipetă	Furnizor general pentru laboratoare
Bloc de gheață sau rece	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete serologice de 10 ml	Furnizor general pentru laboratoare

Echipament	Furnizor
Sigilii adezive pentru plăci cu 96 de godeuri cu următoarele specificații: • Dezlipibile • Adecvate pentru plăci PCR cu manșetă și semimanșetă • Adeziv puternic, rezistent la multiple variații de temperatură între -20 °C și 100 °C • Fără DNază/RNază	Furnizor general pentru laboratoare
Tuburi de microcentrifugă cu capacitate de 1,7 ml, fără nuclează	Furnizor general pentru laboratoare
Colectoare de reactivi fără nuclează (canal de unică folosință, 50 ml) (sau echivalente)	Furnizor general pentru laboratoare
Eprubete conice de 15 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Eprubete conice de 50 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Vârfuri de pipetă compatibile rezistente la aerosoli	Furnizor general pentru laboratoare
Plăci de depozitare cu 96 godeuri, 0,8 ml (plăci MIDI)	Fisher Scientific, nr. piesă AB-0859 sau echivalent
Plăci PCR cu 96 godeuri compatibile cu ciclor termic, 0,2 ml (godeuri din polipropilenă)	Furnizor general pentru laboratoare

Echipamente și materiale postamplificare

Echipament	Furnizor
Instrument NextSeq 550Dx	Illumina, nr. catalog 20005715
Placă centrifugă cu următoarele specificații: • Compatibil cu microplăci cu 96 de godeuri • Putere de centrifugare 280 × g (+/- 10%)	Furnizor general pentru laboratoare
Ciclor termic cu următoarele specificații: • Capac încălzit (100 °C) • Operează în intervalul de temperatură 4 °C-99 °C • Precizia temperaturii ±0,25 °C • Compatibilitate cu plăci PCR cu 96 godeuri, 0,2 ml • Consultați Rata de creștere a temperaturii pentru ciclorul termic la pagina 26	Furnizor general pentru laboratoare

Echipament	Furnizor
Agitator	Furnizor general pentru laboratoare
Incubator de microspecimene cu insert pentru plăci MIDI cu 96 godeuri	Furnizor general pentru laboratoare
Bloc de încălzire uscată cu specificațiile următoare: - Interval de temperatură 25 °C-99 °C - Precizia temperaturii ± 5 °C - Asigurați-vă că tuburile pentru microcentrifugare sunt compatibile cu blocul termic	Furnizor general pentru laboratoare
Placă vibratoare cu următoarele specificații: - Orbită de 2 mm - Turație de agitare 1200 rpm și 1800 rpm	Furnizor general pentru laboratoare
Microcentrifugă	Furnizor general pentru laboratoare
Pană sau rolă de sigilare	Furnizor general pentru laboratoare
Suport magnetic cu următoarele specificații: - Conceput pentru precipitare/separare cu bile paramagnetice - Magneți pe laterala suportului (nu pe fund) - Compatibil cu plăci MIDI cu 96 de godeuri	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete de precizie capabile să livreze cu precizie volume între 2 μ l și 1000 μ l, cu următoarele specificații: - Pipetă cu un singur canal sau multicanal cu increment de 0,02 ml - Pipetă cu un singur canal sau multicanal cu increment de 0,1 μl, 0,2 μl sau 0,5 μl - Pipetă cu un singur canal sau multicanal cu increment de 1 μl sau 2 μl Pipetele trebuie calibrate regulat și precis în interval de 5% din volumul indicat.	Furnizor general pentru laboratoare
Dispozitiv pentru pipetă	Furnizor general pentru laboratoare
Pipete serologice de 10 ml	Furnizor general pentru laboratoare

Echipament	Furnizor
Sigilii adezive pentru plăci cu 96 de godeuri cu următoarele specificații: • Dezlipibile • Adecvate pentru plăci PCR cu manșetă și semimanșetă • Adeziv puternic, rezistent la multiple variații de temperatură între -20 °C și 100 °C • Fără DNază/RNază	Furnizor general pentru laboratoare
Tuburi de microcentrifugă cu capacitate de 2 ml, fără nuclează	Furnizor general pentru laboratoare
Tuburi de microcentrifugă cu capacitate de 1,7 ml, fără nuclează	Furnizor general pentru laboratoare
Colectoare de reactivi fără nuclează (canal de unică folosință, 50 ml) (sau echivalente)	Furnizor general pentru laboratoare
Eprubete conice de 15 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Eprubete conice de 50 ml	Furnizor general pentru laboratoare
Vârfuri de pipetă compatibile rezistente la aerosoli	Furnizor general pentru laboratoare
Plăci de depozitare cu 96 godeuri, 0,8 ml (plăci MIDI)	Fisher Scientific, nr. piesă AB-0859 sau echivalent
Plăci PCR cu 96 godeuri compatibile cu ciclor termic, 0,2 ml (godeuri din polipropilenă)	Furnizor general pentru laboratoare
Bloc de gheață sau rece	Furnizor general pentru laboratoare

Setările de configurare a băii cu ultrasunete pentru fragmentarea ADN-ului

Fragmentarea sau fragmentarea mecanică a ADN influențează performanța testului prin determinarea distribuției dimensiunilor fragmentelor, care afectează, la rândul său, acoperirea secvențierii. S-au evaluat și optimizat o serie de configurații specifice pentru băi cu ultrasunete pentru testul TSO Comprehensive (UE) ([Tabelul 4](#)).

- Timpul de fragmentare mecanică a fost ajustat pentru maximizarea valorii MEDIAN_EXON_COVERAGE, subliniată în secțiunea [Controlul calității la pagina 81](#). Timpii de fragmentare (consultați [Tabelul 4](#)) și rezultatele pentru MEDIAN_INSERT_SIZE au fost diferite, în funcție de configurație.
- Configurațiile 1–4 și 6 au fost testate cu tuburi de sticlă cu 8 benzi. Configurația 5 a utilizat o singură eprubetă de sticlă. Volumele tuburilor sunt prezentate în [Tabelul 4](#).

- La optimizarea configurațiilor 3–6 (volume mai mici de băi de apă) s-a utilizat metoda pulsatorie.
- Configurațiile 3–5 au fost împărțite în tuburi cu volum mai mic. Volumele tubului afectează parametrii de fragmentare.
- Configurația 4 (transductor în linie, volum mediu baie de apă, apă degazificată) a necesitat un timp lung de întârziere a impulsului (40 secunde) pentru a obține o MEDIAN_EXON_COVERAGE similară configurațiilor 1 și 2 la o intrare nominală de 40 ng.
- Setările optime pentru configurația 3 au dus la o distribuție ușor mai mare a dimensiunii fragmentelor comparativ cu celelalte configurații (MEDIAN_INSERT_SIZE a fost cu aproximativ 5-10 perechi de baze mai mare).
- Configurațiile 3 și 5 au utilizat apă nedegazificată și cel mai mic volum al băii de apă.
- Configurațiile 3 și 5 au necesitat o intrare crescută a ADN-ului (50 ng pentru configurația 3, 60 ng pentru configurația 5) pentru a obține o MEDIAN_EXON_COVERAGE similară față de celelalte 4 configurații, care au utilizat intrarea nominală de 40 ng.
- Configurațiile 3 și 5 au înregistrat deteriorare și/sau denaturare mai puternică și, prin urmare, au produs o masă efectivă redusă de molecule dsADN pentru pregătirea bibliotecii.

Centrifugați tuburile de fragmentare mecanică în timpul procesului de recuperare, pentru a se asigura obținerea volumului specificat, deoarece orice pierdere de material poate afecta negativ performanța.

Tabelul 4 Configurații de băi cu ultrasunete specifice evaluate

Parametru	Configurație					
	1	2	3	4	5	6
Transductor	Linie	Punct	Punct	Linie	Punct	Linie
Volum baie de apă	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Apă degazeificată	Da	Da	Nu	Da	Nu	Da
Răcitor de apă	Da	Da	Da	Da	Da	Da
Temperatură baie de apă	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Putere incidentă de vârf (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% factor de utilizare	30	10	30	25	20	25
Cicluri/pulsație	200	200	1000	1000	1000	600
Impulsuri (pulsații de 10 secunde)	Nu	Nu	Da	Da	Da	Da
Timp întârziere pulsație	Nu se aplică	Nu se aplică	10 s	40 s	10 s	10 s
Timp defragmentare mecanică	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Procesarea specimenului	1-8	1	1	1-8	1	1-8
Dimensiunea seriei	1-96	1-96	1-8	1-8	1	1-96
Volum specimen, bandă de 8 tuburi din sticlă	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Un singur tub (50 µl)	130 µl (sau 96 placă microTUBE)
Diluare	Nu se aplică	Nu se aplică	Nu se aplică	3 mm Y la 20 mm/s	Nu se aplică	1,5 mm Y la 10 mm/s
Echivalent introducere ADN (pentru acoperire medie exoni)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Timpul de fragmentare mecanică de 200 secunde constă din pulsații de 10 secunde, repetate de 20 de ori.

² Timpul de fragmentare mecanică de 320 secunde constă din pulsații de 10 secunde, repetate de 32 de ori.

Rata de creștere a temperaturii pentru ciclul termic

Rata de creștere a temperaturii pentru ciclul termic afectează valorile CC ale testului (locații MSI utilizabile, numărul mediu din țintă CNV, dimensiunea medie a inserțiilor (ARN)), precum și citirile de susținere pentru variante splice și fuziuni. Se recomandă optimizarea ratei de creștere a temperaturii pentru ciclul termic. De exemplu, un model testat a fost ajustat de la o rată de creștere implicită (și maximă) de 5 °C/s la una de 3 °C/s, pentru a obține rezultate comparabile cu alte modele cu rată de creștere a temperaturii implicită mai scăzută.

Colectarea, transportul și depozitarea probei

Urmați procedura standard de colectare, transport, depozitare și procesare a specimenelor.

Cerințe privind speciamentele

Țesut FFPE

Testul TSO Comprehensive (UE) necesită 40 ng de ARN și/sau 40 ng de ADN extrase din țesut FFPE. Utilizarea de ARN și ADN împreună permite analiza tuturor tipurilor de variante ipotetice. Țesutul trebuie fixat cu fixator cu formalină pentru analize moleculare (de exemplu, formalină neutră tamponată 10%). Țesutul nu trebuie decalcificat. Înainte de efectuarea testului TSO Comprehensive (UE), specimenul de țesut trebuie examinat de un patolog pentru a vă asigura că este adecvat pentru testare. Pentru detecția mutațiilor somatice conducătoare sunt necesare 20% de conținut tumoral (în suprafață). Detectarea sigură a statusului MSI într-o varietate de speciamente necesită un conținut tumoral de minimum 30%. Dacă un specimen este testat cu un conținut tumoral mai mic de 30% pentru a determina rezultatele cu alte tipuri de variante, un rezultat MS-Stabil poate fi nesigur. Un rezultat MSI-High este corect, indiferent de conținutul tumoral.

Conținutul tumoral pentru amplificări de gene și variante ARN depinde de nivelul de amplificare sau exprimarea fuziunii (consultați [Conținut tumoral la pagina 104](#)).

Pentru o probabilitate ridicată de a extrage 40 ng ARN și 40 ng ADN din diferite tipuri de țesut solid, volumul tisular recomandat este $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Acest volum este echivalent cu o suprafață cumulativă de țesut viabil $\geq 200 \text{ mm}^2$ utilizând secțiuni cu grosimea de $5 \mu\text{m}$ sau $\geq 100 \text{ mm}^2$ utilizând secțiuni cu grosimea de $10 \mu\text{m}$. Aria cumulată a țesutului reprezintă suma ariilor țesutului viabil din toate secțiunile propuse pentru extracție. De exemplu, o arie cumulată a țesutului de 200 mm^2 poate fi obținută extrăgând patru secțiuni de $5 \mu\text{m}$ cu arie totală de 50 mm^2 sau cinci secțiuni de $10 \mu\text{m}$ cu arie totală de 20 mm^2 . Necroza tisulară poate reduce cantitatea de acid nucleic obținută. Pentru a minimiza posibilitatea de rezultate fals negative, țesutul poate fi macrodisecat pentru a obține conținut tumoral dezirabil.

O cantitate ridicată de țesut necrotic ($\geq 23\%$ după locație) poate interfera cu capacitatea testului TSO Comprehensive (UE) de a detecta amplificări de gene și fuziuni ARN. Dacă secțiunile de specimen prezintă necroză în proporție de peste 23% din totalul zonei tisulare, se impune macrodisecția țesutului necrotic. Dacă laboratorul rulează ARN cu testul, țesutul cu hemoglobină trebuie evitat sau minimizat atunci când se obțin secțiuni din blocul de țesut. Consultați [Substanțe care interferează la pagina 94](#).

Țesutul FFPE fixat pe lamele poate fi păstrat până la 28 de zile la temperatura ambiantă.

Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic

- Extrageți ARN și ADN din specimene de țesuturi FFPE cu kituri de extracție disponibile pe piață. Diferențele între kiturile de extracție pot afecta performanțele. Consultați [Evaluarea kitului de extracție a acidului nucleic la pagina 93](#).
- Nu creșteți proteinaza K sau o enzimă echivalentă în timpul extracției din concentrația standard furnizată într-un kit de extracție. Consultați [Substanțe care interferează la pagina 94](#).
- Depozitați baza de acid nucleic extras urmând instrucțiunile producătorului kitului de extracție.
- Depozitați ADN extras timp de până la 28 de zile între -25 °C și -15 °C.
- Depozitați ARN extras timp de până la 28 de zile între -85 °C și -65 °C.
- Pentru a evita modificarea în timp a concentrației, măsurați ADN și ARN în termen de 28 de zile după ce ați început pregătirea bibliotecii. Cuantificați ARN-ul și ADN-ul printr-o metodă de cuantificare fluorimetrică cu coloranți legați de acizii nucleici. Concentrația acidului nucleic ar trebui să reprezinte media a cel puțin trei măsurători.
- Testul necesită 40 ng din fiecare specimen de ARN preparat în RNase/DNase-free water (nefurnizat), în volum final de 8,5 μl (4,7 ng/μl).
- Testul necesită 40 ng din fiecare specimen de gADN, la concentrație minimă de extracție de 3,33 ng/μl. Fragmentarea mecanică necesită un volum final de 52 μl (0,77 ng/μl) cu minimum 40 μl TEB (furnizat) ca diluant.

Depozitarea bibliotecilor

Depozitați bibliotecile în plăci PCR cu legare redusă între 7 și 32 de zile, în funcție de tipul de bibliotecă (consultați [Tabelul 5](#)).

Tabelul 5 Timpi de depozitare a bibliotecilor

Tip bibliotecă	Placă	Număr de zile	Temperatură de depozitare
ADNc	PCF PCR	≤ 7	între -25 °C și -15 °C
ADN fragmentat	LP PCR	≤ 7	între -25 °C și -15 °C
Preconcentrare	ALS PCR	≤ 30	între -25 °C și -15 °C
Postconcentrare	ELU2 PCR	≤ 7	între -25 °C și -15 °C
Postconcentrare PCR	PL PCR	≤ 30	între -25 °C și -15 °C
Normalizată	NL PCR	≤ 32	între -25 °C și -15 °C

Avertizări și precauții

Siguranță



AVERTIZARE

Acest set de reactivi conține substanțe chimice potențial periculoase. Se pot produce vătămări corporale prin inhalare, ingerare, contact cu pielea și contact cu ochii. Ventilația trebuie să fie adecvată pentru manipularea materialelor periculoase în reactivi. Purtați echipament de protecție, inclusiv protecție pentru ochi, mănuși și halat de laborator corespunzătoare riscului de expunere. Manipulați reactivii folosiți ca deșeuri chimice și eliminați-i în conformitate cu legile și reglementările regionale, naționale și locale aplicabile. Pentru informații suplimentare privind mediul, sănătatea și siguranța, consultați fișierele SDS la adresa support.illumina.com/sds.html.

- Manipulați toate speci­menele ca și când ar fi potențial infecțioase.
- Utilizați măsurile de precauție obișnuite pentru activitățile de laborator. Nu pipetați cu gura. Nu mâncați, nu beți și nu fumați în spațiile de lucru desemnate. Purtați mănuși de unică folosință și halate de laborator atunci când manipulați speci­mene și reactivi pentru testare. După ce manipulați speci­mene și reactivi pentru teste, spălați-vă temeinic pe mâini.

Laborator

- Pentru a preveni contaminarea, asigurați un flux de lucru de laborator unidirecțional. Zonele de preamplificare și postamplificare trebuie dotate cu echipamente și materiale dedicate (de exemplu, pipete, vârfuri de pipetare, agitator vortex și centrifugă). Pentru a preveni amplificarea produsului sau contaminarea prin transfer a sondei, evitați să reveniți în zona de preamplificare după ce ați intrat în cea de postamplificare.
- Efectuați pașii Indexare PCR și Concentrare în zona de postamplificare pentru a preveni contaminarea prin transfer a produsului amplificării.
- Procedurile de pregătire a bibliotecii necesită un mediu fără-ARNază/ADNază. Decontaminați temeinic zonele de lucru cu soluție de curățare inhibitoare de-ARNază/ADNază. Utilizați produse din plastic certificate fără ADNază, ARNază și ADN genomic uman.
- Curățați temeinic suprafețele de lucru și echipamentele înainte și după fiecare procedură postamplificare cu soluție 0,5% de hipoclorit de sodiu (NaOCl). Lăsați soluția să acționeze pe suprafețele de contact 10 minute și ștergeți temeinic cu alcool etilic sau izopropilic de 70%.
- Utilizați eprubete de microcentrifugă, plăci, vârfuri de pipetă și colectoare fără nuclează.
- Utilizați echipamente calibrate pe întreaga durată a analizei. Calibrați echipamentele la vitezele, temperaturile și volumele specificate în prezentul protocol.

- Utilizați pipete de precizie pentru a asigura transferul precis al reactivilor și probelor. Calibrați cu regularitate, conform specificațiilor producătorului.
- Dacă utilizați pipete multicanal, urmați recomandările de mai jos:
 - pipetați minimum $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Asigurați-vă că vârfurile de pipetă cu barieră se fixează corect și sunt adecvate mărcii și modelului de pipetă multicanal.
 - Fixați vârfurile prin rulare, pentru a vă asigura că toate vârfurile s-au fixat corect.
 - Aspirați în unghi de 90° , asigurându-vă volumele de lichid din fiecare vârf de pipetă sunt egale.
 - După distribuție, mixați toate componentele prin pipetare repetată.
 - După distribuție, asigurați-vă că s-a distribuit complet lichidul în fiecare vârf de pipetă.
- Asigurați-vă că utilizați echipamentul specificat pentru analiză și că ați configurat programele conform instrucțiunilor.
- Temperaturile specificate pentru ciclul termic și incubatorul de microprobe indică temperatura de reacție, mai degrabă decât temperatura nominală a echipamentului.

Analiză

- Evitați contaminarea încrucișată.
 - Respectați practicile de laborator adecvate la manipularea specimenelor și reactivilor.
 - Utilizați consumabile de laborator și vârful de pipetă noi pentru fiecare specimen și fiecare distribuție de reactivi.
 - Utilizați vârful rezistent la aerosolizare pentru a reduce riscul de contaminare încrucișată între probe.
 - Utilizați un flux de lucru unidirecțional în trecerea de la zona de preamplificare la cea de postamplificare.
 - Manipulați și deschideți câte un singur primer de indexare o dată. Închideți fiecare tub de index cu capacul imediat după utilizare. Kitul include capace suplimentare.
 - Schimbați-vă mănușile frecvent și dacă intră în contact cu primerii de indexare sau speciemenele.
 - Eliminați tuburile de primeri de indexare neutilizate din zona de lucru.
 - Nu returnați reactivii în tuburile de depozitare după utilizarea în tuburi de bandă, canale sau colectoare.
 - Mixați probele cu pipeta și centrifugați placa dacă procedura o impune.
 - Utilizați un agitator de microplăci. Nu utilizați un agitator vortex.
- Nu schimbați componentele pentru test din diferite loturi de testare între ele. Loturile de kituri de reactivi sunt identificate pe eticheta cutiei kitului și pe fișa principală a lotului.
- Se impune respectarea practicilor de laborator corecte și pentru a împiedica contaminarea cu produse PCR a reactivilor, instrumentarului și specimenelor de ADN genomic. Contaminarea cu nuclează și PCR poate determina rezultate inexacte și nesigure.
- Pentru efectuarea optimă a analizei și pentru stocare sunt obligatorii tipurile adecvate de plăci. Asigurați-vă că ați respectat instrucțiunile de transfer al plăcilor din [Instrucțiuni de utilizare la pagina 39](#).

- Nerespectarea procedurilor menționate poate duce la rezultate greșite sau la reducerea semnificativă a calității bibliotecilor.
- Dacă în [Instrucțiuni de utilizare la pagina 39](#), nu se specifică un punct de oprire în siguranță, continuați imediat cu pasul următor.
- Depozitați reactivii și componentele pentru analiză la temperatura specificată, în zonele stabilite de pre-amplificare și post-amplificare.
- Nu depozitați reactivii într-o unitate fără gheață sau în compartimentele de pe ușile frigiderelor.
- Nu congelați reactivii care conțin bile (LNB1, SPB și SMB).
- Nu utilizați reactivi care au fost depozitați incorect.
- Nu deviați de la procedurile de mixare și manipulare specificate pentru fiecare reactiv. Mixarea necorespunzătoare sau agitarea vortex excesivă a reactivilor poate duce la eșecul rezultatelor pentru specimenul respectiv.
- FSM, SSM, ERA1-B și TCB1 pot conține particule legate de produs. Urmăriți instrucțiunile de manipulare pentru fiecare reactiv. După efectuarea pașilor de mixare a FSM și SSM, particulele albe rămase nu vor afecta performanța.
- Preparați amestecuri principale noi și eliminați volumele rămase după utilizare.
- Preparați întotdeauna etanol 80% cu RNase/DNase-free water (apă fără ARNază/ADNază) pentru pașii de spălare. Etanolul poate să absoarbă umiditatea din aer, aceasta putând afecta rezultatele. Eliminați etanolul 80% după utilizare conform reglementărilor locale, regionale și/sau naționale.
- Transferați volumul de eluat specificat. Transferul unui volum de eluat mai mic decât cel specificat în pașii de eluare poate afecta rezultatele.
- Respectați recomandările de mai jos pentru băi cu ultrasunete. Asigurați-vă că ați respectat instrucțiunile producătorului.
 - Încărcați gADN în tubul pentru baie cu ultrasunete lent, pentru a evita formarea de bule. Bulele în exces sau o barieră de aer în tubul de fragmentare mecanică pot duce la fragmentare incompletă.
 - Distribuți substanțe în tuburile pentru baie cu ultrasunete lent, evitând să stropiți.
 - Pentru a evita dislocarea lichidelor și pierderea specimenului, nu introduceți vârful de pipetă până la fundul tubului pentru baie cu ultrasunete pentru scoaterea ADN fragmentat.
- Nu pipetați mai puțin de 2 µl de specimen.
- Nu utilizați pentru distribuția reactivilor canale în pașii care necesită adăugarea a mai puțin de 10 µl de material în fiecare godeu.
- Transferați specimenul gDNA fragmentat din tuburile pentru baie cu ultrasunete pe placa de pregătire a bibliotecii (LP) cu o pipetă cu vârf fin.
- Nu combinați adaptorii SUA1 și UMI.
- Utilizați adaptorii SUA1 cu specimene ARN.
- Utilizați adaptorii UMI cu specimene ADN.

- Alocați primeri de indexare diferiți pentru fiecare specimen de bibliotecă, pentru identificarea unică a fiecărei biblioteci într-un grup pentru secvențiere din celulă flow cell unică.
- Nu combinați primerii de indexare CPxx și UPxx în aceeași bibliotecă.
- Nepotrivirile între probe și primerii de indexare pot duce la raportarea incorectă a rezultatelor din cauza absenței identificării probelor pozitive. Introduceți ID probe și atribuiți indecși în Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE) înainte de a începe pregătirea bibliotecii. Înregistrați ID probe, indexarea și orientarea godeurilor de pe placă pentru referințe în timpul pregătirii bibliotecii.
- Utilizați exclusiv indecși UPxx pentru bibliotecile derivate din specimene ARN.
- Utilizați indecși UPxx și CPxx pentru bibliotecile derivate din specimene ADN.
- Secvențiați maximum 8 biblioteci ARN și 8 biblioteci ADN per celulă de flux. Secvențiați minimum trei biblioteci. Urmați recomandările din [Număr de biblioteci și selectarea indecșilor la pagina 36](#).
- După pasul de legare din [Captură, prima țintă la pagina 60](#), și [Captură, a doua țintă la pagina 64](#), treceți imediat la pasul de spălare pentru a împiedica uscarea peletelor cu bile.
- În pașii de spălare, eliminați complet etanolul 80% de pe fundul godeurilor. S-a demonstrat că etanolul rezidual are impact asupra rezultatelor.
- Pentru performanțe optime ale analizei, respectați numărul de spălări indicat în [Instrucțiuni de utilizare la pagina 39](#).
- În cadrul procedurii [Normalizarea bibliotecilor la pagina 71](#), resuspendați atent peleta cu bile a bibliotecii pentru a asigura consecvența densității în celula de flux.
- Raportați imediat orice incidente grave în legătură cu acest produs către Illumina și autoritățile competente ale statelor membre în care sunt rezidenți utilizatorul și pacientul.

Note procedurale

- Fluxul de lucru TSO Comprehensive (UE) poate fi desfășurat conform planului de mai jos:
 - Ziua 1: sinteză cADN din specimene ARN, fragmentare ADN din specimene gADN, pregătirea bibliotecii și inițializarea hibridizării peste noapte (prima hibridizare).
 - Ziua 2: concentrare, normalizarea bibliotecilor concentrate și încărcarea bibliotecilor în Instrumentul NextSeq 550Dx.

Dacă efectuarea fluxului de lucru TSO Comprehensive (UE) este imposibilă conform acestui plan, protocolul include câteva puncte de oprire în siguranță. Dacă în protocol nu se specifică un punct de oprire în siguranță, continuați imediat cu pasul următor.
- Bibliotecile derivate din probe de ARN și ADN pot fi pregătite simultan în godeuri separate.
- Prepararea amestecului principal include crearea de volume excedentare pentru a asigura volumul suficient pentru numărul de specimene procesat.
- Utilizați apă de uz molecular, fără nuclează.

- După adăugarea reactivului, curățați vârful de pipetă aspirând și distribuind o dată în godeul adecvat al plăcii, dacă procedura nu specifică contrariul.
- Temperatura camerei este definită ca fiind intervalul dintre 15 °C și 30 °C.
- Reactivii, speciemenle și/sau bibliotecile trebuie păstrate la rece în anumiți pași descriși în Instrucțiunile de utilizare. Această operațiune este definită ca păstrarea pe gheață sau pe un mediu echivalent.

Programarea ciclului termic

- Programați ciclul termic pe echipamentele de preamplificare și postamplificare înainte de a inițializa protocolul.
- Asigurați-vă că plăcile PCR se fixează corect în ciclul termic.
- Utilizați plăci recomandate de producătorul ciclului termic.

Sigilarea și desigilarea plăcii

- Sigilați întotdeauna placa cu folie adezivă nouă. Nu reutilizați folia adezivă.
- Pentru sigilarea plăcii, aplicați corect folia adezivă pe placă cu o pană sau o rolă de sigilare.
- Sigilați întotdeauna placa cu 96 de godeuri cu folie nouă înaintea următorilor pași din protocol.
 - Pași de agitare a plăcii
 - Pași de centrifugare
 - Pașii pentru ciclul termic
 - Hibridizări
 - Stocare pe termen lung
- Asigurați-vă că marginile și godeurile sunt sigilate, pentru a reduce riscul de contaminare încrucișată și de evaporare.
- Puneți placa pe o suprafață plană înainte de a îndepărta încet sigiliul.
- Înainte de desigilarea plăcii, dacă observați orice fel de fluid sau condens pe folia adezivă sau pereții laterali ai godeurilor, centrifugați 1 minut la 280 x g.
- Utilizați folii adezive de sigilare eficiente în intervalul -20 °C - 100 °C, adecvate pentru plăci PCR cu manșetă sau semimanșetă.

Echipament

- Asigurați-vă că personalul laboratorului s-a familiarizat înainte de inițializarea analizei cu instrucțiunile de operare și întreținere ale producătorilor pentru toate echipamentele.

Tipuri de plăci și transferul plăcilor

- Pentru efectuarea optimă a analizei și pentru stocare sunt obligatorii tipurile adecvate de plăci.

- La transferul de volume între plăci, transferați volumul specificat din fiecare godeu de pe o placă în godeul corespunzător al plăcii de destinație.
- Pot fi utilizate pipete multicanal pentru transferul specimenelor între benzi de tuburi sau plăci.
- Pentru agitarea plăcilor, urmați recomandările de mai jos.
 - Agitați plăcile pe un agitator de plăci. Nu utilizați un agitator vortex.
 - Agitați plăcile PCR la 1200 RPM.
 - Agitați plăcile MIDI la 1800 RPM.
 - Urmăriți instrucțiunile producătorului pentru a asigura fixarea în siguranță a plăcilor pe agitator.

Centrifugare

- Dacă instrucțiunile din protocol prevăd centrifugarea scurtă, centrifugați 1 minut la 280 x g.
- Dacă observați lichid pe folia de sigilare sau pe pereții laterali ai godeului, centrifugați placa 1 minut la 280 x g.

Manipularea reactivilor

- Reînchideți etanș toate tuburile cu reactivi imediat după utilizare, pentru a limita evaporarea și a împiedica contaminarea.
- Readuceți reactivii la temperatura de depozitare specificată după ce nu mai sunt necesari pentru o procedură.
- Urmăriți pașii de preparare a reactivilor care preced fiecare procedură din secțiunea respectivă a [Instrucțiuni de utilizare la pagina 39](#).
- Asigurați-vă că ați preparat volumul necesar de amestec principal, amestec de eluare și etanol 80% pentru speciemenele procesate.
- Volumele specificate în tabelul cu amestecuri principale și soluții includ volumul excedentar. Volumul excedentar se calculează după cum urmează.
 - [Tabelul 14](#)
 - Volum FSM = (7,2 µl) x (număr de specimene + controale) x (1,25).
 - Volum RVT = (0,8 µl) x (număr de specimene + controale) x (1,25).
 - [Tabelul 21](#)
 - Volum ERA1-B = (7,2 µl) x (număr de librării) x (1,20).
 - Volum ERA1-A = (2,8 µl) x (număr de librării) x (1,20).
 - [Tabelul 29](#)
 - Volum EE2 = (20,9 µl) x (număr de librării) x (1,364).
 - Volum HP3 = (1,1 µl) x (număr de librării) x (1,364).
 - [Tabelul 30](#)

- Volum EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{număr de librării}) \times (1,364)$.
- Volum HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{număr de librării}) \times (1,364)$.
- [Tabelul 36](#)
 - Volum LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{număr de librării}) \times (2,0)$.
 - Volum LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{număr de librării}) \times (2,0)$.
- [Tabelul 37](#)
 - Volum EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{număr de librării}) \times (1,25)$.
 - Volum HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{număr de librării}) \times (1,25)$.

Seturi de adaptor

- Analiza TSO Comprehensive (UE) include adaptoare SUA1 și UMI.
- Utilizați adaptorii SUA1 cu specimene ARN. A nu se utiliza cu specimene ADN.
- Utilizați adaptorii UMI cu specimene ADN. A nu se utiliza cu specimene ARN.

Manipularea bilelor

- Testul TSO Comprehensive (UE) include trei tipuri de bile (SPB, SMB și LNB1). Asigurați-vă că utilizați tipul de bile corect în cadrul procedurii.
- Efectuați numărul corect de spălări pentru fiecare tip de bile.
- Asigurați-vă că bilele sunt la temperatura ambiantă înainte de utilizare.
- Mixați bilele 1 minut înainte de utilizare pentru omogenizare.
- Urmați instrucțiunile de mai jos la mixarea bilelor cu pipeta:
 - Utilizați pipete și vârfuri de pipetă de dimensiunile adecvate volumului mixat.
 - Ajustați setarea de volum la aproximativ 50-75% din volumul specimenului.
 - Pipetați lent, fără a elibera pistonul.
 - Evitați să stropiți sau să încorporați bule de aer.
 - Poziționați pipeta deasupra peletei și distribuiți direct în peletă pentru a elibera bilele din godeu sau tub.
 - Asigurați-vă că peleta cu bile este complet acoperită cu soluție. Soluția ar trebui să aibă culoarea maro închis și consistență omogenă.
 - Verificați dacă este prezentă peleta cu bile. Aspirați atent soluția cu bile totală din godeu în vârful de pipetă și examinați fundul godeurilor.
- Dacă bilele s-au aspirat în pipetă în pașii de separare magnetică, distribuiți bilele înapoi în godeul de pe placa de pe suportul magnetic. Așteptați să se limpezească lichidul (aproximativ 2 minute) înainte de a trece la pasul următor al procedurii.
- Pentru spălarea bilelor:
 - Utilizați suportul magnetic adecvat pentru placă.

- Distribuți lichidul direct pe peleta cu bile pentru a umecta bilele de pe pereții laterali ai godeului.
- Mențineți placa pe suportul magnetic până la momentul de îndepărtare specificat în procedură.
- Nu agitați placa pe suportul magnetic.
- Nu perturbați peleta cu bile în timp ce placa se află pe suportul magnetic.
- La spălarea bilelor sau eliminarea supernatantului, poziționați vârful de pipetă oblic față de fundul godeurilor, pentru a evita vidarea și aspirarea soluției în filtrele de vârf de pipetă.

Număr de biblioteci și selectarea indecșilor

Înainte de configurarea ciclului, planificați numărul de biblioteci de specimene și de indecși pentru specimene din ciclul de secvențiere. Ghidul de mai jos privind numărul de specimene include controalele pozitive, excluzând controalele negative/fără șablon (NTC). NTC trebuie adăugate în ciclul planificat ca specimene suplimentare.

Pentru TSO Comprehensive (UE), urmați îndrumările din [Tabelul 6](#) și [Tabelul 7](#) pentru a determina numărul de biblioteci ARN și/sau ADN de secvențiat pe o celulă de flux. Consultați [Tabelul 6](#) dacă secvențiați separat bibliotecile ARN sau ADN. Consultați [Tabelul 7](#) dacă secvențiați bibliotecile ARN și ADN pe aceeași celulă de flux.

Tabelul 6 Secvențierea bibliotecilor ARN sau ADN

Tip bibliotecă	Minimum*	Maximum*
Numai ARN	3	16
Numai ADN	3	8

* NTC nu contribuie la plexitate.

Tabelul 7 Secvențierea bibliotecilor ARN și ADN pe aceeași celulă de flux

Tip bibliotecă	Minimum*	Maximum*
ARN	3	8
ADN	3	8

* NTC nu contribuie la plexitate.

Pentru utilizarea *optimă* a reactivului la secvențierea bibliotecilor ADN și ARN cu TSO Comprehensive (UE) pe Instrumentul NextSeq 550Dx, secvențiați 8 biblioteci ARN și 8 biblioteci ADN per celulă de flux.

Primerii de indexare asigură identificatori unici pentru fiecare specimen, astfel încât bibliotecile să poată fi grupate pentru secvențiere într-o singură celulă de flux. Combinațiile de indecși compatibile se afișează pe ecranul Create Run (creare ciclu) la configurarea ciclului cu Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE). În timpul pregătirii bibliotecii, adăugați primer de indexare la fiecare bibliotecă de specimene. **Utilizați amestecuri de primeri de indexare diferite pentru fiecare bibliotecă de specimene.**

Asigurați-vă că primerii de indexare pe care îi utilizați împreună cu speci­me­nele corespund indecșilor selectați pentru analiză din Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE).

Nepotrivirile pot duce la raportarea incorectă a rezultatelor din cauza absenței identificării probelor pozitive.

Există două tipuri de indecși în analiza TSO Comprehensive (UE).

- **Indecși UPxx** - Utilizați indecși UPxx pentru biblioteci derivate din speci­me­ne ADN sau ARN.
- **Indecși CPxx** - Utilizați indecși CPxx pentru biblioteci derivate din speci­me­ne ADN. Nu utilizați indecși CPxx pentru biblioteci derivate din ARN sau dacă se secvențiază numai trei biblioteci ADN în total.

Dacă secvențiați doar trei biblioteci, se aplică următoarele cerințe:

- Bibliotecile trebuie să fie integral ADN, fie integral ARN.
- Nu utilizați seturi de indecși CPxx.
- Este obligatoriu ca unul dintre seturile de indecși UPxx să asigure suficientă diversitate.
 - UP01, UP02 și UP03
 - UP04, UP05 și UP06
 - UP07, UP08 și UP09
 - UP10, UP11 și UP12

De exemplu, pentru prima bibliotecă se atribuie UP01, pentru a doua UP02 și pentru a treia UP03.

TruSight Oncology Controale

TSO Comprehensive (UE) necesită Controale TruSight Oncology, conținând Controlul ADN TruSight Oncology și Controlul ARN TruSight Oncology ca controale pozitive. Includeți Controlul ADN TruSight Oncology pentru fiecare ciclu de secvențiere ADN și Controlul ARN TruSight Oncology pentru fiecare ciclu de secvențiere ARN în cadrul unui eveniment de pregătire a bibliotecii (includeți și controalele pentru cicluri ADN și ARN combinate). Se prepară un control pozitiv unic pentru fiecare ciclu de sequencing run. Pentru mai multe informații, consultați Prospect pentru controalele TruSight Oncology (nr. document 200009919).

Cantitatea de intrare pozitivă pentru control este de 40 ng pentru ADN și ARN.

Includeți NTC-ul corespunzător în fiecare eveniment de pregătire a bibliotecii ARN și ADN. NTC este secvențiat repetat în cadrul unui eveniment de pregătire bibliotecă. Urmăți aceste instrucțiuni pentru Controale TruSight Oncology:

- Pregătiți bibliotecile din controalele pozitive și fără șablon la fel cu speci­me­nele.
- Utilizați TEB pentru NTC ADN.
- Utilizați apă fără ADNază/ARNază pentru NTC ARN.
- Controalele pozitive sunt incluse în cerințele maxime pentru biblioteci.
- NTC nu sunt incluse în cerințele minime pentru biblioteci.
- Utilizați indecși UP pentru NTC dacă secvențiază numai 3 biblioteci.

- Deoarece NTC este secvențiat repetat, indecșii selectați pentru acest control nu pot fi repetați în pregătirea bibliotecii.

Următoarele tabele prezintă configurații de plăci pentru pregătirea bibliotecii. Fiecare coloană numerotată reprezintă un ciclu unic de secvențiere. Dacă se secvențiază împreună biblioteci ADN și ARN, fiecare set de coloane corespondente reprezintă un ciclu de secvențiere unic (de exemplu, coloana 1 și coloana 7). NTC se secvențiază pentru fiecare coloană sau set de coloane.

Tabelul 8 Pregătirea bibliotecii pentru ciclu unic, cu șase specimene de la pacienți

	1	2	3	4	5	6	7
A	Control ADN poz.	gol	gol	gol	gol	gol	Control ARN poz.
B	ADN 1	gol	gol	gol	gol	gol	ARN 1
C	ADN 2	gol	gol	gol	gol	gol	ARN 2
D	ADN 3	gol	gol	gol	gol	gol	ARN 3
E	ADN 4	gol	gol	gol	gol	gol	ARN 4
F	ADN 5	gol	gol	gol	gol	gol	ARN 5
G	ADN 6	gol	gol	gol	gol	gol	ARN 6
H	ADN NTC	gol	gol	gol	gol	gol	NTC ARN

Tabelul 9 Pregătirea bibliotecii pentru trei cicluri, cu 20 de specimene de la pacienți

	1	2	3	4	5	6	7
A	Control ADN poz.	Control ADN poz.	Control ADN poz.	gol	Control ARN poz.	Control ARN poz.	Control ARN poz.
B	ADN 1	ADN 7	ADN 14	gol	ARN 1	ARN 7	ARN 14
C	ADN 2	ADN 8	ADN 15	gol	ARN 2	ARN 8	ARN 15
D	ADN 3	ADN 9	ADN 16	gol	ARN 3	ARN 9	ARN 16
E	ADN 4	ADN 10	ADN 17	gol	ARN 4	ARN 10	ARN 17
F	ADN 5	ADN 11	ADN 18	gol	ARN 5	ARN 11	ARN 18
G	ADN 6	ADN 12	ADN 19	gol	ARN 6	ARN 12	ARN 19
H	ADN NTC	ADN 13	ADN 20	gol	NTC ARN	ARN 13	ARN 20

Instrucțiuni de utilizare

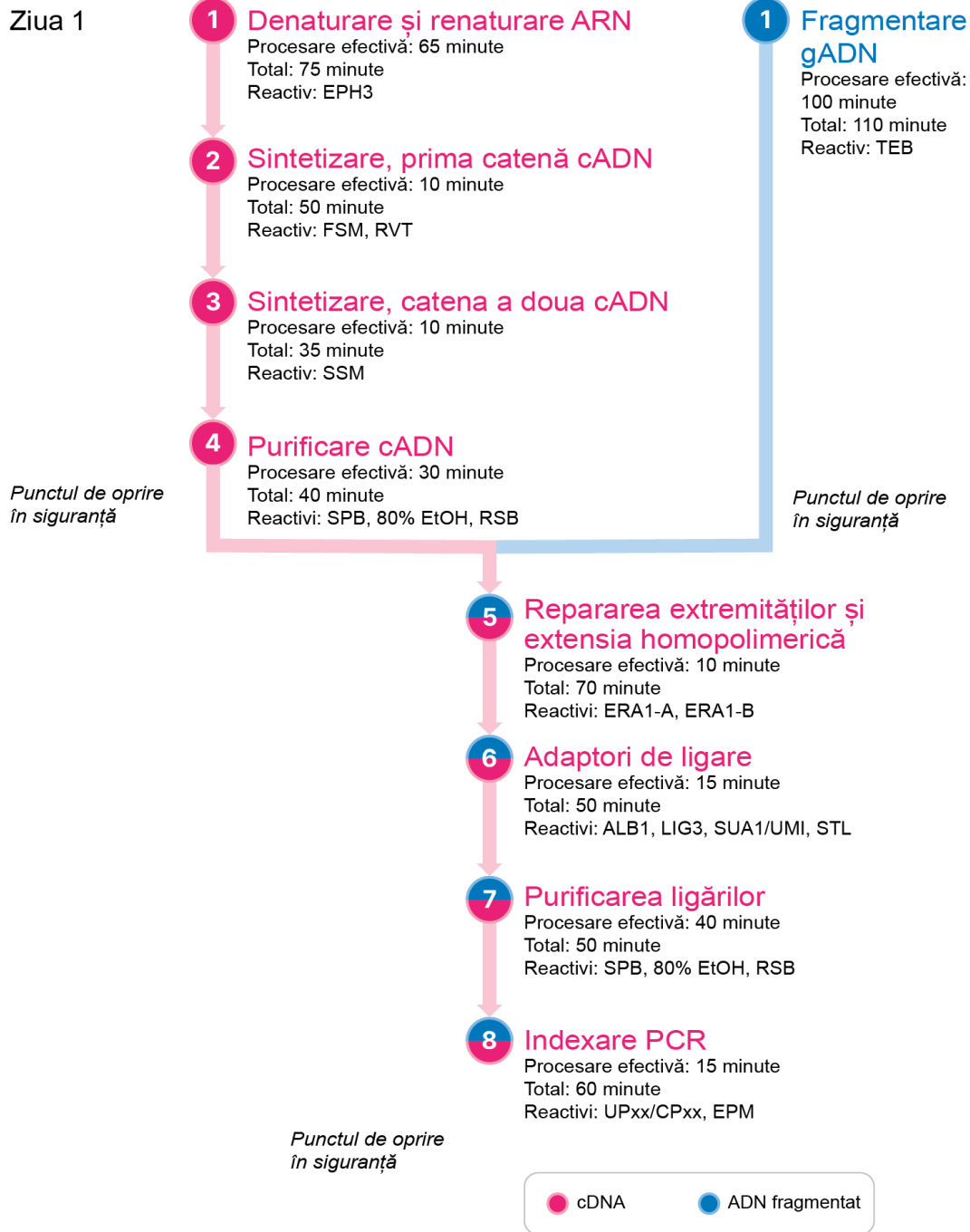
Figura 1 și Figura 2 conțin o prezentare generală a fluxului de lucru TSO Comprehensive (UE).

Flux de lucru pentru pregătirea bibliotecii

Figura 1 ilustrează fluxul de lucru pentru pregătirea bibliotecii pentru TSO Comprehensive (UE). Bibliotecile derivate din probe de ARN și ADN pot fi pregătite simultan în godeuri separate. Controalele pozitive și fără șablon se procesează la fel cu speciemenele. Punctele de oprire în siguranță sunt marcate între pași.

Înainte de a începe protocolul, introduceți informațiile despre ciclul de procesare și specimen în Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE). Consultați *Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE)* (nr. document 200008661).

Figura 1 Flux de lucru TSO Comprehensive (UE) (Partea 1)

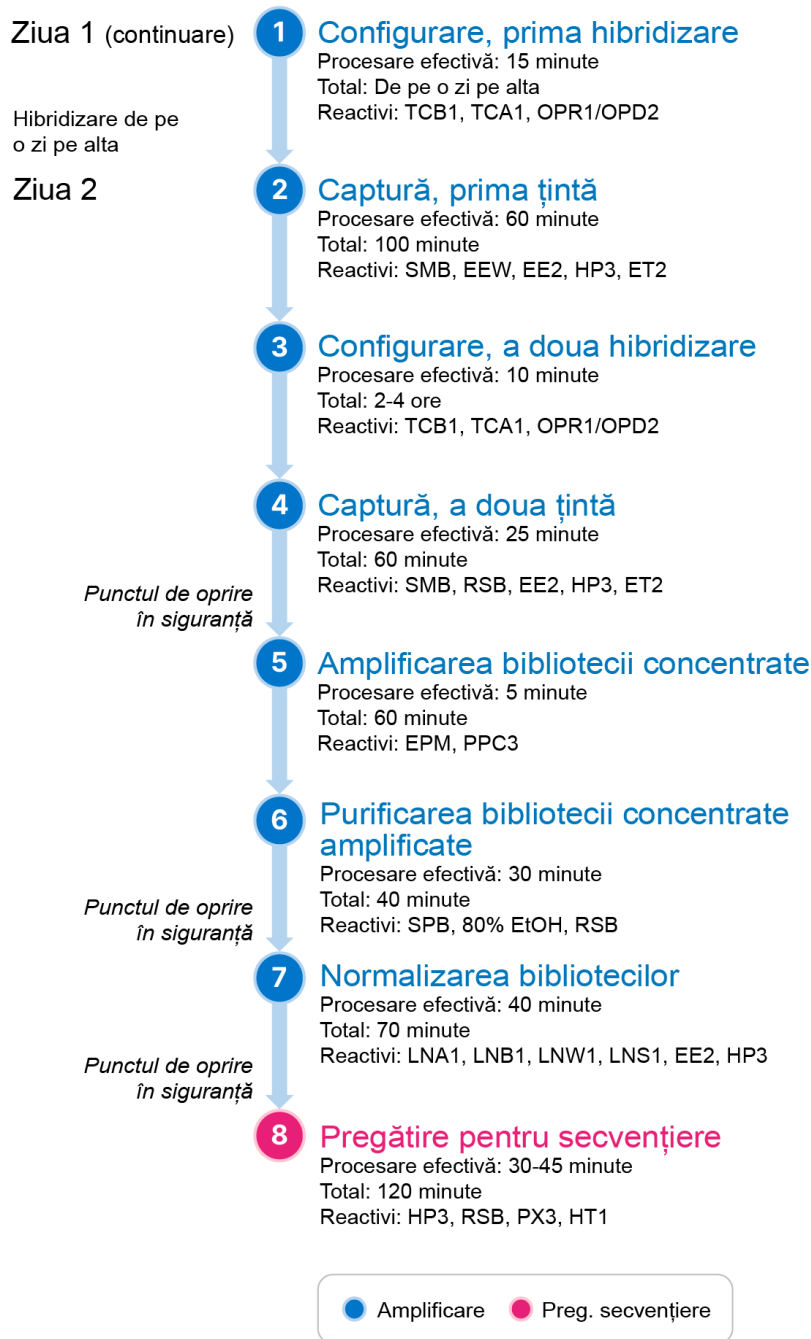


* Timpii de procesare efectivă și totali sunt aproximativi.

Flux de lucru pentru concentrare

Figura 2 ilustrează fluxul de lucru pentru TSO Comprehensive (UE). Punctele de oprire în siguranță sunt marcate între pași.

Figura 2 TSO Comprehensive (UE) Flux de lucru (Partea 2)



Programarea cicloarelor termice

Înainte de a inițializa analiza, salvați programele de mai jos, de preamplificare și postamplificare, pentru cicloare termice.

Tabelul 10 Programe de preamplificare pentru ciclul termic

Pas din procedură	Denumire program	Temperatura capacului	Volum de reacție	Parametrii ciclului termic
Denaturare și renaturare ARN	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C timp de 5 minute • 4 °C timp de 1 minut • Mențineți la 4 °C
Sintetizare, prima catenă cADN	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C timp de 10 minute • 42 °C timp de 15 minute • 70 °C timp de 15 minute • 4 °C timp de 1 minut • Mențineți la 4 °C
Sintetizare, catena a doua cADN	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C timp de 25 minute • 4 °C timp de 1 minut • Mențineți la 4 °C

NOTĂ Dacă nu se poate seta temperatura capacului pentru sintetizare, catena 2ndSS, la 30 °C, dezactivați opțiunea de preîncălzire a capacului.

Tabelul 11 Programe de postamplificare pentru ciclul termic

Pas din procedură	Denumire program	Temperatura capacului	Volum de reacție	Parametrii ciclului termic
Indexare PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C timp de 30 secunde • 15 cicluri de: • 98 °C timp de 10 secunde • 60 °C timp de 30 secunde • 72 °C timp de 30 secunde • 72 °C timp de 5 minute • Mențineți la 10 °C
Efectuare, prima hibridizare	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C timp de 10 minute • 85 °C, 2 minute 30 secunde • 75 °C, 2 minute 30 secunde • 65 °C, 2 minute 30 secunde • Mențineți 57 °C între 8 și 24 ore

Pas din procedură	Denumire program	Temperatura capacului	Volum de reacție	Parametrii ciclurului termic
Efectuare a doua hibridizare	HYB2	100 °C	50 µl	95 °C timp de 10 minute 85 °C, 2 minute 30 secunde 75 °C, 2 minute 30 secunde 65 °C, 2 minute 30 secunde - Mențineți 57 °C între 1,5 și 4 ore
Amplificarea bibliotecii concentrate	EL-PCR	100 °C	50 µl	98 °C, 30 s 18 cicluri la: 98 °C, 10 s 60 °C, 30 s 72 °C, 30 s 72 °C, 5 min - Mențineți la 10 °C

Pregătirea pentru Protocol

Această pregătire este necesară pentru a efectua pașii protocolului înainte de următorul punct de oprire sigur.



ATENȚIE

Toate procedurile din fluxul de lucru necesită mediu fără ARNază/ADNază.

1. Decontaminați temeinic zonele de lucru cu soluție de curățare inhibitoare de ARNază/ADNază.
2. Asigurați-vă că ați setat programele de preamplificare ale ciclurului termic. Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
3. Urmați instrucțiunile producătorului pentru configurarea băii cu ultrasunete.
4. Dacă procesați doar specimene ADN, treceți direct la pasul [Fragmentare gADN la pagina 49](#).
5. Scoateți controale ADN din depozit.
6. Scoateți tuburile de reactivi din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabelul 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (PN 20031127)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
EPH3	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Denaturare și renaturare ARN
FSM	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Sintetizare, prima catenă cADN
RVT	între -25 °C și -15 °C	A se păstra la rece.	Sintetizare, prima catenă cADN

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SSM	între -25 °C și -15 °C	Decongețați la temperatura ambiantă.	Sintetizare, catena a doua cADN

Tabelul 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (refrigerat) (PN 20031119)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SPB (etichetă verde deschis)	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Purificare cADN
RSB	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Purificare cADN

Denaturare și renaturare ARN

Acest proces denaturează ARN purificat și îl amorsează cu hexameri aleatorii ca pregătire pentru sinteza cADN.

Pregătirea

- Pregătiți următorii reactivi.
 - EPH3 - Lăsați deoparte.
 - FSM - Mixați în agitator vortex. Centrifugați scurt amestecul și apoi mixați-l prin pipetare. Reactivul poate conține particule albe, asociate produsului. Nu se impune nicio acțiune din partea utilizatorului. Nu afectează performanțele produsului.
 - RVT - Centrifugați scurt amestecul și apoi mixați-l prin pipetare. A se păstra la rece.

NOTĂ RVT este o soluție vâscoasă. Minimizați formarea de bule de aer în timpul pipetării.

- Pentru prepararea amestecului principal FSM + RVT combinați, într-un tub de microcentrifugă, următoarele volume.

Tabelul 14 Amestec principal FSM+RVT*

Componente, amestec principal	4 biblioteci (μl)	8 biblioteci (μl)	16 biblioteci (μl)	24 biblioteci (μl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Tabelul include și volumele excedentare. Consultați [Manipularea reactivilor la pagina 34](#), pentru calcule.

- Mixați prin pipetare de 10 ori.

4. Păstrați amestecul principal FSM + RVT la rece până la efectuarea pasului [Sintetizare, prima catenă cADN la pagina 45](#).

Procedura

1. Păstrați speci­me­nele de ARN extrase și controalele ARN la rece în timpul decon­gelării. Proce­sați controalele ARN ca speci­me­ne pe durata restului pro­to­co­lului.
2. Păstrați ARN-ul la rece atunci când nu îl utilizați. Consultați [Cerințe privind speci­me­nele la pagina 27](#), pentru cuantificarea speci­me­nelor.
3. Mixați fiecare speci­men de ARN prin pipetare de 10 ori.
4. Folosiți RNase/DNase-free water (apă fără DNază/RNază) pentru a prepa­ra câte 40 ng din fiecare speci­men de ARN într-un volum final de 8,5 µl (4,7 ng/µl).
Pentru controalele ARN, utilizați concentrația specificată pe eticheta tubului.
5. Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri CF (legare cADN).
6. Adăugați 8,5 µl din fiecare speci­men ARN într-un godeu separat al plăcii CF PCR.
7. Asigurați-vă că configurația plăcii și indecșii pentru fiecare speci­men corespund ciclului planificat la configura­re în Modul de analiză TSO Comprehensive (UE).
8. Mixați EPH3 în agita­tor vortex și apoi centrifugați scurt.
9. Adăugați câte 8,5 µl EPH3 în fiecare godeu pentru speci­me­ne.
10. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CF PCR.



ATENȚIE

Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.

11. Agitați 1 minut la 1200 rpm.
12. Centrifugați 1 minut la 280 x g.
13. Introduceți în ciclul termic și rulați programul LQ-RNA.
Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
14. Atunci când speci­me­nele ajung la 4 °C, mențineți timp de 1 minut. Treceți imediat la pasul următor.

Sintetizare, prima catenă cADN

Acest proces transcrie invers fragmentele de ARN amorsate cu hexameri aleatorii în prima catenă cADN prin reverse transcriptase (transcriptază inversă)

Procedura

1. Scoateți placa CF PCR din ciclul termic.
2. Mixați prin pipetare de 10 ori amestecul principal FSM + RVT. Asigurați-vă că ați omogenizat complet amestecul FSM + RVT.
3. Adăugați 8 µl de amestec principal FSM + RVT în fiecare godeu pentru speci­me­ne.

4. Mixați prin pipetare de 10 ori.
5. Eliminați restul de amestec principal FSM + RVT.
6. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CF PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
7. Agitați 1 minut la 1200 rpm.
8. Centrifugați 1 minut la 280 x g.
9. Introduceți în ciclul termic și rulați programul 1stSS.
Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
10. Când speci­me­nele ajung la 4 °C treceți imediat la pasul următor.
Speci­me­nele pentru prima catenă pot fi păstrate 5 minute la 4 °C.

Sintetizare, catena a doua cADN

Acest proces elimină șablonul ARN și sintetizează cADN cu catenă dublă.

Pregătirea

1. Pregătiți SSM:
 - a. Mixați prin răsturnare de 10 ori.
 - b. Centrifugați scurt. Reactivul poate conține particule albe, asociate produsului. Nu se impune nicio acțiune. Nu afectează performanțele produsului.

Procedura

1. Scoateți placa CF PCR din ciclul termic.
2. Adăugați câte 25 µl SSM în fiecare godeu pentru speci­me­ne.
3. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CF PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
4. Agitați 1 minut la 1200 rpm.
5. Centrifugați 1 minut la 280 x g.
6. Introduceți în ciclul termic și rulați programul 2ndSS.
Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
7. Când speci­me­nele ajung la 4 °C, mențineți 1 minut și treceți imediat la pasul următor.

Purificare cADN

În acest proces se utilizează SPB pentru purificarea cADN de compuși de reacție nedorți. Bilele se spală de două ori cu EtOH 80% proaspăt preparat. Pentru eluarea cADN se folosește RSB.

Pregătirea

1. Pregătiți următorii reactivi.
 - SPB - Aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - RSB - Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
2. Preparați EtOH 80% proaspăt într-o eprubetă conică de 15 ml sau 50 ml în felul următor.

Tabelul 15 Preparați EtOH 80% proaspăt

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

3. Mixați EtOH 80% proaspăt preparat în agitator vortex.
4. Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri BIND1 (legare cADN).
5. Acoperiți și lăsați deoparte.
6. Pregătiți magnetul.

Procedura

Legare

1. Scoateți placa CF PCR din ciclorul termic.
2. Mixați SPB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
3. Adăugați imediat câte 90 µl de SPB în fiecare godeu de specimene al plăcii BIND1 MIDI.
Dacă distribuiți SPB cu canal, includeți un factor de excedent de 1,15 la alicotarea de material suficient pentru specimen. Eliminați toate resturile de materiale după ce ați adăugat SPB în fiecare godeu.
4. Transferați întregul volum (50 µl) din fiecare specimen din placa CF PCR în godeul corespunzător al plăcii BIND1 MIDI.
5. Eliminați placa CF PCR goală.
6. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BIND1 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
7. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
8. Incubați la temperatura ambiantă timp de 5 minute.
9. Plasați placa BIND1 MIDI pe un suport magnetic timp de 5 minute.
10. Țineți placa pe suportul magnetic. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu pentru specimene, fără a perturba peleta cu bile.

Spălare

1. Spălați bilele după cum urmează.

- a. Mențineți placa BIND1 MIDI pe suportul magnetic și adăugați 200 µl de EtOH 80% proaspăt preparat în fiecare godeu.
 - b. Așteptați 30 de secunde.
 - c. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu pentru specimene, fără a perturba peleta cu bile.
2. Spălați bilele a **doua** oară.
 3. Utilizați o pipetă cu vârfuri fine pentru a îndepărta EtOH rezidual din fiecare godeu.
 4. Eliminați EtOH 80% neutilizat.

Eluare

1. Îndepărtați placa BIND1 MIDI de pe suportul magnetic.
2. Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
3. Adăugați câte 22 µl RSB în fiecare godeu pentru specimene.
4. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BIND1 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
5. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
6. Incubați la temperatura camerei timp de 2 minute.
7. Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
8. Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri PCF (fragmente cADN purificate).
Dacă vă opriți la [PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ la pagina 48](#), utilizați o placă PCR.
9. Transferați 20 µl de eluat din fiecare godeu de specimene al plăcii BIND1 MIDI în godeurile corespundente ale plăcii PCF.
10. Eliminați placa BIND1 MIDI goală.
11. Adăugați câte 30 µl de RSB în fiecare godeu de specimene al plăcii PCF.
12. Mixați prin pipetare de 10 ori.
13. Sigilați placa PCF cu folie autoadezivă și lăsați-o la rece.
14. Redepozitați EPH3, FSM, RVT și SSM.
15. Dacă procesați specimene derivate doar din ARN (cADN) și nu vă opriți la punctul de oprire în siguranță, treceți la [Repararea extremităților și extensia homopolimerică la pagina 52](#).

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, centrifugați placa PCF PCR 1 minut la 280 x g și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 7 zile.

Pregătirea pentru protocol

Această pregătire este necesară pentru a efectua pașii protocolului înainte de următorul punct de oprire sigur.

1. Scoaterea controalelor ADN din depozit.

- Scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabelul 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (refrigerat) (PN 20031119)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
TEB	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Fragmentare gADN

Fragmentare gADN

Acest proces fragmentează gADN și generează fragmente de dsADN cu prelungiri 3' sau 5'.

Pregătirea

- Urmați recomandările din [Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28](#).
- Pregătiți TEB - Mixați prin răsturnare sau în agitator vortex.

Procedura

Pregătiți placa

Selectați una dintre următoarele opțiuni de pregătire a plăcii:

- Procesați speci­menele gADN simultan cu speci­mene cADN în placa PCF MIDI.
 - Etichetați placa PCF MIDI cu LP (Library Preparation - pregătirea bibliotecii).
 - Păstrați-o deoparte la rece pentru utilizarea în pasul [Transferul ADN fragmentat la pagina 50](#).
- Procesați speci­menele gADN simultan cu speci­mene cADN, cu placa PCF PCR congelată.
 - Decongelați placa PCF PCR la temperatura ambiantă.
 - Centrifugați 1 minut la 280 x g.
 - Mixați prin pipetare de 10 ori.
 - Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri cu LP (pregătirea bibliotecii).
 - Transferați integral 50 µl din fiecare specimen din placa PCF PCR în godeul corespunzător al plăcii LP MIDI.
 - Eliminați placa PCF PCR.
 - Sigilați cu folia autoadezivă și lăsați la rece până la utilizarea în pasul [Transferul ADN fragmentat la pagina 50](#).
- Procesați doar speci­mene de gADN.
 - Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri cu LP (pregătirea bibliotecii).
Dacă vă opriți la [PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ la pagina 51](#), utilizați o placă PCR.
 - Acoperiți-o și lăsați-o deoparte pentru utilizarea în pasul [Transferul ADN fragmentat la pagina 50](#).

Diluarea gADN

1. Decongeați specișenele de gADN și controalele ADN la temperatura ambiantă.
2. Mixați fiecare specimen de gADN prin pipetare de 10 ori.
3. Centrifugați scurt eprubeta pentru colectarea picăturilor fine.
4. Mixați TEB prin răsturnare sau în agitator vortex.
5. Preparați un volum final de specimen de gADN de 52 µl, cu TEB. Consultați tabelul de mai jos pentru cantitățile introduse și concentrațiile minime în funcție de tipurile de specișene.
 - Analiza necesită o concentrație minimă de extracție corespunzătoare cu minimum 40 µl TEB din volumul de 52 µl.
 - Pentru controalele ADN, utilizați concentrația specificată pe eticheta eprubetei.
 - Pentru a împiedica pierderile de specișene, nu pipetați mai puțin de 2 µl de specimen în această diluție.

Tipul de probă	Cantitate introdusă (ng)	Concentrație minimă (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Control	40	Consultați eticheta eprubetei

Fragment

1. Adăugați 52 µl din fiecare specimen gADN într-un godeu separat al tubului pentru baie cu ultrasunete.



ATENȚIE

Adăugați lent gADN în eprubetă, asigurându-vă nu există gol de aer la fundul eprubetei. Pentru informații suplimentare, consultați [Analiză la pagina 30](#), și instrucțiunile producătorului.

2. Înregistrați orientarea benzii.
3. Fragmentați gADN într-o baie cu ultrasunete.

Transferul ADN fragmentat

1. Asigurați-vă că configurația plăcii cu specimen și indecșii pentru fiecare specimen coincid cu ciclul selectat pentru analiza cu Modul de analiză TSO Comprehensive (UE).
2. Urmați instrucțiunile producătorului băii cu ultrasunete pentru recuperarea specimenului.

La unele tipuri de eprubete pentru băi cu ultrasunete, este necesară centrifugarea pentru consolidarea specimenului în eprubetă.
3. Pentru fiecare specimen de gADN fragmentat, efectuați câte trei transferuri a câte 16,7 µl cu o pipetă cu vârful fine într-un godeu gol al plăcii LP MIDI.
4. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP MIDI.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, aplicați folie de sigilare autoadezivă pe placa LP PCR și centrifugați-o 1 minut la 280 x g. Depozitați la temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 7 zile.

Pregătirea pentru protocol

Această pregătire este necesară pentru a efectua pașii protocolului înainte de următorul punct de oprire sigur. Asigurați-vă că ați setat programele de postamplificare ale ciclului termic. Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).

1. Pregătiți o găleată cu gheață sau un echivalent.
2. Scoateți tuburile de reactivi din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabelul 17 Cutie TruSight Oncology Comp Library Prep (congelat) (PN 20031118)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
ERA1-A	între -25 °C și -15 °C	A se păstra la rece.	Repararea extremităților și extensia homopolimerică
ERA1-B	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Repararea extremităților și extensia homopolimerică
ALB1	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Adaptori de ligare
LIG3	între -25 °C și -15 °C	A se păstra la rece.	Adaptori de ligare
SUA1 (capac albastru)	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Adaptori de ligare
UMI (capac alb)	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Adaptori de ligare
STL	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Adaptori de ligare
EPM	între -25 °C și -15 °C	A se păstra la rece.	Indexare PCR

Tabelul 18 Cutie TruSight Oncology Comp Library Prep (refrigerați) (PN 20031119)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SPB (etichetă verde deschis)	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Purificarea ligărilor

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
RSB	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Purificarea ligărilor

Tabelul 19 Cutie TruSight Oncology Comp UP Index Primers (PN 20031120)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
UPxx	între -25 °C și -15 °C	Decongelați tuburile cu primer de indexare corespunzătoare la temperatura ambiantă.	Indexare PCR

Tabelul 20 Cutie TruSight Oncology Comp CP Index Primers (PN 20031126)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
CPxx	între -25 °C și -15 °C	Decongelați tuburile cu primer de indexare corespunzătoare la temperatura ambiantă.	Indexare PCR

Repararea extremităților și extensia homopolimerică

Procesul repară prelungirile rezultate din fragmentare în extremități cu extensie homopolimerică folosind un amestec principal End Repair A-Tailing (ERA1).

Activitatea de exonuclează între 3' și 5' a acestui amestec elimină prelungirile 3', iar activitatea de polimerază între 5' și 3' completează prelungirile 5'. Extremitățile 3' primesc extensii homopolimerice în această reacție, împiedicând ligarea între extremități în timpul reacției de ligare a adaptorilor.

Pregătirea

- Preîncălziți 2 incubatoare de microspecimene cu un bloc termic MIDI, după cum urmează.
 - Preîncălziți un incubator de microspecimene la 30 °C.
 - Preîncălziți un incubator de microspecimene la 72 °C.
- Pregătiți următorii reactivi.
 - ERA1-A - Centrifugați scurt amestecul și apoi mixați-l prin pipetare. A se păstra la rece.
 - ERA1-B - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
Verificați dacă prezintă precipitare. Dacă există precipitare, încălziți tubul la 37 °C și apoi mixați prin pipetare până la dizolvarea precipitatului.

3. Preparați amestec principal ERA1 într-un tub de microcentrifugare.

Tabelul 21 Amestec principal ERA1*

Componente, amestec principal	4 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
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

* Tabelul include și volumele excedentare. Consultați [Manipularea reactivilor la pagina 34](#), pentru calcule.

4. Mixați prin pipetare lentă de 10 ori pentru omogenizare, apoi centrifugați scurt. Păstrați amestecul principal ERA1 la rece.
5. Pentru a pregăti placa, selectați una dintre următoarele opțiuni:
- Dacă speci­me­nele se află pe o placă MIDI, preparați după cum urmează.
 - a. Reetichetați placa MIDI cu LP2 (pregătire bibliotecă 2).
 - b. Dacă unele speci­me­ne sunt în plăci MIDI sepa­rate, mutați toate speci­me­nele în godeuri sepa­rate ale aceleiași plăci MIDI, conform configurației plăcii.
 - Dacă placa este congelată, preparați-o după cum urmează.
 - a. Deconge­lați placa PCF PCR sau placa LP PCR la temperatura ambiantă.
 - b. Centrifugați placa 1 minut la 280 x g.
 - c. Mixați prin pipetare de 10 ori.
 - d. Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri cu LP2 (pregătire bibliotecă 2).
 - e. Transferați întreaga cantitate de 50 µl din fiecare speci­men din placa PCFP CR sau placa LP PCR în godeul corespunzător al plăcii LP2 MIDI.
 - f. Eliminați plăcile PCF PCR sau LP PCR.

Procedura

1. Adăugați câte 10 µl de amestec principal ERA1 în fiecare godeu al plăcii LP2 MIDI.
2. Eliminați restul de amestec principal ERA1.
3. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
4. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
5. Incubați 30 minute în incubator de microspecimene preîncălzit, la 30 °C.
6. Transferați imediat într-un alt incubator de microspecimene preîncălzit.
7. Incubați la 72 °C timp de 20 de minute.
8. Păstrați placa LP2 MIDI la rece timp de 5 minute.

Adaptori de ligare

Prin acest proces se efectuează ligarea adaptorilor la extremitățile fragmentelor de cADN și/sau gADN.

Analiza TSO Comprehensive (UE) include adaptoare SUA1 și UMI.

- Utilizați adaptorii SUA1 cu specimene ARN.
- Utilizați adaptorii UMI cu specimene ADN.

Pregătirea

1. Pregătiți următorii reactivi.
 - ALB1 - Mixați în agitator vortex minimum 10 secunde și apoi centrifugați scurt.
 - LIG3 - Centrifugați scurt amestecul și apoi mixați-l prin pipetare. A se păstra la rece.
 - SUA1 - Mixați în agitator vortex minimum 10 secunde și apoi centrifugați scurt.
 - UMI - Mixați în agitator vortex minimum 10 secunde și apoi centrifugați scurt.
 - STL - Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.

Procedura

1. Scoateți placa LP2 MIDI din gheață sau un mediu echivalent.
2. Adăugați 60 µl de ALB1 în fiecare godeu pentru specimene al plăcii LP2 MIDI. ALB1 este o soluție vâscoasă. Pipetați încet pentru a minimiza formarea de bule.
3. Adăugați 5 µl de LIG3 în fiecare godeu pentru probe.
4. Adăugați adaptoare după cum urmează.
Nu combinați tipuri diferite de adaptoare.
 - **Godeuri pentru probe de ARN**—Adăugați 10 µl de SUA1 (capac albastru) în fiecare probă derivată din ARN.
 - **Godeuri pentru probe de ADN**—Adăugați 10 µl de UMI (capac alb) în fiecare probă derivată din ADN.
5. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
6. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
7. Incubați la temperatura camerei timp de 30 de minute.
8. Agitați STL pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.
9. Adăugați 5 µl de STL în fiecare godeu pentru probe al plăcii LP2 MIDI.
10. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
11. Agitați 2 minute la 1800 rpm.

Purificarea ligărilor

Acest proces utilizează SPB pentru a purifica fragmentele de cADN sau gADN ligate cu adaptori și elimină produșii nedoriti. Bilele se spală de două ori cu etanol 80% proaspăt preparat. Specimenele cu adaptori liganți sunt eluate cu RSB.

Pregătirea

1. Pregătiți următorii reactivi.
 - SPB - Aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - RSB - Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
2. Preparați EtOH 80% proaspăt într-o eprubetă conică de 15 ml sau 50 ml.

Tabelul 22 Preparați etanol 80% proaspăt

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

3. Mixați EtOH 80% proaspăt preparat în agitator vortex.
4. Pregătiți magnetul.

Procedura

Legare

1. Mixați SPB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
2. Adăugați imediat câte 112 µl de SPB în fiecare godeu de specimene al plăcii LP2 MIDI.
Dacă distribuiți SPB cu canal, includeți un factor de excedent de 1,15 la alicotarea de material suficient pentru specimen. Eliminați toate resturile de materiale după ce ați adăugat SPB în fiecare godeu.
3. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
4. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
5. Incubați la temperatura ambiantă timp de 5 minute.
6. Plasați placa LP2 MIDI 10 minute pe un suport magnetic.
7. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu pentru specimene, fără a perturba peleta cu bile.

Spălare

1. Spălați bilele după cum urmează.
 - a. Mențineți placa LP2 MIDI pe suportul magnetic și adăugați 200 μ l de EtOH 80% proaspăt preparat în fiecare godeu de specimene.
 - b. Așteptați 30 de secunde.
 - c. Cu o pipetă configurată la 200 μ l, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare godeu pentru specimene, fără a perturba peleta cu bile.
2. Spălați bilele a **două** oară.
3. Utilizați o pipetă cu vârfuri fine pentru a îndepărta EtOH rezidual din fiecare godeu.
4. Eliminați EtOH 80% neutilizat.

Eluare

1. Luați placa LP2 MIDI de pe suportul magnetic.
2. Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
3. Adăugați câte 27,5 μ l RSB în fiecare godeu pentru specimene.
4. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
5. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
6. Incubați la temperatura camerei timp de 2 minute.
7. Plasați placa LP2 MIDI 2 minute pe un suport magnetic.
8. Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu LS (pregătirea bibliotecii).
9. Transferați câte 25 μ l de eluat din placa LP2 MIDI în godeul corespunzător al plăcii LS PCR.
10. Eliminați placa LP2 MIDI goală.

Indexare PCR

În acest pas, se amplifică fragmentele din bibliotecă cu primeri care adaugă secvențe index pentru multiplexarea specimenului. Produsul rezultat conține biblioteca cADN completă și/sau fragmente de ADN flancate de adaptorii necesari pentru generarea clusterelor.

Pregătirea

1. Pregătiți următorii reactivi.
 - EPM - Păstrați la rece.
 - UPxx - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. UPxx este primerul de indexare selectat pe ecranul Create Run (creare ciclu) al software-ului Local Run Manager la configurarea ciclului.
 - CPxx - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. CPxx este primerul de indexare selectat pe ecranul Create Run (creare ciclu) al software-ului Local Run Manager la configurarea ciclului.

2. Asigurați-vă că indecșii pentru fiecare specimen corespund ciclului planificat pe Modul de analiză TSO Comprehensive (UE) la configurarea ciclului. Urmați instrucțiunile privind selectarea indecșilor din [Număr de biblioteci și selectarea indecșilor la pagina 36](#)



ATENȚIE

Nepotrivirile între probe și primerii de indexare pot duce la raportarea incorectă a rezultatelor din cauza absenței identificării probelor pozitive.

Procedura

1. Adăugați 5 µl de primer de indexare adecvat (UPxx sau CPxx) în godeul corespunzător din placa LS PCR, conform indecșilor selectați.



ATENȚIE

Manipulați și deschideți câte un singur tub de primer de indexare o dată. Închideți fiecare tub de index cu capac nou după utilizare. Nu combinați primerii de indexare între ei.

2. Mixați EPM în agitator vortex 5 secunde, apoi centrifugați scurt.
3. Adăugați câte 20 µl EPM în fiecare godeu pentru specimene.
4. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa LS PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile pentru a preveni evaporarea.
5. Agitați 1 minut la 1200 rpm.
6. Redepozitați reactivii de preamplificare.



ATENȚIE

Efectuați toți pașii ulteriori în zona de postamplificare pentru a preveni contaminarea prin transfer a produsului amplificării.

7. Centrifugați placa LS PCR 1 minut la 280 x g.
8. Introduceți-o în ciclul termic de postamplificare preprogramat și rulați programul I-PCR.
Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
Dacă continuați cu [Configurare, prima hibridizare la pagina 58](#), urmați instrucțiunile de decongelare din Pregătirea pașilor protocolului.
9. După finalizarea programului I-PCR, centrifugați placa LS PCR 1 minut la 280 x g.
10. Reetichetați-o ca ALS (Amplified Library Samples/specimene de bibliotecă amplificate).

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, depozitați placa ALS PCR la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 30 zile.

Pregătirea pentru protocol

Această pregătire este necesară pentru a efectua pașii protocolului care duc la hibridizarea peste noapte.

1. Asigurați-vă că ați setat programele de postamplificare ale ciclului termic. Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
2. Scoateți tuburile de reactivi din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabelul 23 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerat) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
TCB1	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Configurare, prima hibridizare

Tabelul 24 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congealați) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
TCA1	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Configurare, prima hibridizare

Tabelul 25 Cutie TruSight Oncology Comp Content Set (PN 20031122)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
OPR1 (capac roșu)	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Configurare, prima hibridizare
OPD2 (capac alb)	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Configurare, prima hibridizare

Configurare, prima hibridizare

În acest proces, un grup de oligonucleotide hibridizează bibliotecile cADN și un grup de oligonucleotide hibridizează bibliotecile gADN pregătite în pasul [Indexare PCR la pagina 56](#). Amplificarea zonelor țintă necesită doi pași de hibridizare. La prima hibridizare, oligonucleotidele hibridizează bibliotecile cADN și/sau gADN de pe o zi pe alta (8-24 ore).

Pregătirea

1. Pregătiți următorii reactivi.
 - TCB1 – Încălziți tubul 5 minute la 37 °C. Mixați în agitator vortex 10 minute și apoi centrifugați scurt.
 - TCA1 – Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - OPR1 – Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

- OPD2 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
- 2. Dacă placa ALS PCR a fost depozitată, decongelați-o la temperatura ambiantă și centrifugați-o 1 minut la 280 x g. Mixați prin pipetare.
- 3. Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri HYB1 (hibridizare 1).

Procedura

1. Transferați câte 20 µl din biblioteca cDNA și/sau gDNA din placa ALS PCR în godeul corespondent al plăcii HYB1 PCR.
2. Sigilați placa ALS PCR cu folie autoadezivă și lăsați-o deoparte.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
3. Verificați dacă TCB1 prezintă precipitare. Dacă prezintă precipitare, reîncălziți tubul și agitați-l în agitator vortex până la dizolvarea cristalelor.
4. Adăugați câte 15 µl de TCB1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii HYB1 PCR.
5. Adăugați câte 10 µl de TCA1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii HYB1 PCR.
6. Adăugați sondele.
Nu combinați tipuri de sonde diferite. Adăugați câte un set de sonde per godeu.
 - **[Godeuri de bibliotecă ARN]**—Adăugați 5 µl OPR1 (capac roșu) în fiecare bibliotecă derivată din ARN.
 - **[Godeuri de bibliotecă ADN]**—Adăugați 5 µl OPD2 (capac alb) în fiecare bibliotecă derivată din ADN.
7. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa HYB1 PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
8. Agitați 2 minute la 1200 rpm.
9. Introduceți în ciclorul termic și rulați programul HYB1.
Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
10. Hibridizați între minimum 8 ore și maximum 24 ore la 57 °C.
11. Redepozitați reactivii de hibridizare.
12. Depozitați placa ALS PCR la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 30 de zile.

Pregătirea pentru protocol

Această pregătire este necesară pentru a efectua pașii protocolului înainte de următorul punct de oprire sigur. La începutul zilei 2, scoateți tubul de reactiv din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabelul 26 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerat) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SMB (etichetă albastru închis)	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambientă timp de 30 de minute.	Captură, prima țintă Captură, a doua țintă
ET2	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambientă.	Captură, prima țintă Captură, a doua țintă
HP3	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambientă.	Captură, prima țintă Captură, a doua țintă Normalizarea bibliotecilor
TCB1	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambientă.	Configurare, a doua hibridizare
RSB	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambientă.	Captură, a doua țintă Purificarea bibliotecii concentrate amplificate

Tabelul 27 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congealați) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
EE2	între -25 °C și -15 °C	Decongealați la temperatura ambientă.	Captură, prima țintă Captură, a doua țintă Normalizarea bibliotecilor
EEW	între -25 °C și -15 °C	Decongealați la temperatura ambientă.	Captură, prima țintă
TCA1	între -25 °C și -15 °C	Decongealați la temperatura ambientă.	Configurare, a doua hibridizare

Tabelul 28 Cutie TruSight Oncology Comp Content Set (PN 20031122)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
OPR1 (capac roșu)	între -25 °C și -15 °C	Decongealați la temperatura ambientă.	Configurare, a doua hibridizare
OPD2 (capac alb)	între -25 °C și -15 °C	Decongealați la temperatura ambientă.	Configurare, a doua hibridizare

Captură, prima țintă

Acest pas utilizează SMB pentru captarea de sonde hibridizate pe zonele de interes țintă. Bilele se spală de trei ori cu EEW. Bibliotecile concentrate sunt eluate cu amestec de eluare EE2 + HP3 proaspăt preparat și neutralizate cu ET2.

Pregătirea

1. Preîncălziți un incubator de microspecimene cu un bloc termic MIDI la 57 °C.
2. Pregătiți următorii reactivi.
 - EEW - Mixați 1 minut în agitator vortex.
 - EE2 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - HP3 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - SMB - Aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute. Utilizați **SMB**, nu SPB, pentru această procedură.
 - ET2 - Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
3. Preparați amestec de eluare EE2 + HP3 într-un tub de microcentrifugare.

Tabelul 29 Amestec de eluare EE2 + HP3 pentru captare, prima țintă

Componente, amestec de eluare	4 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Tabelul include și volumele excedentare. Consultați [Manipularea reactivilor la pagina 34](#), pentru calcule.

4. Mixați amestecul de eluare EE2 + HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. Lăsați deoparte pentru pasul [Eluare la pagina 62](#).
5. Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri CAP1 (captare 1).
6. Pregătiți magnetul.

Procedura

Legare

1. Scoateți placa HYB1 PCR din ciclul termic.
2. Centrifugați placa HYB1 PCR 1 minut la 280 x g.
3. Mixați SMB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele. Dacă există precipitat sau peleta de picături, asigurați-vă că ați atins temperatura camerei, pipetați în sus și în jos pentru a elibera peleta, apoi agitați pentru a o suspenda din nou.
4. Adăugați imediat câte 150 µl de SMB în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP1 MIDI. Dacă distribuiți SMB cu canal, includeți un factor de excedent de 1,15 la alicotare pentru a permite material suficient pentru specimen.
5. Eliminați toate resturile de materiale după ce ați adăugat SMB în fiecare godeu.
6. Configurați pipeta la 50 µl și transferați întregul volum din fiecare bibliotecă din placa HYB1 PCR în godeul corespondent al plăcii CAP1 MIDI.
7. Eliminați placa HYB1 PCR goală.

8. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP1 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
9. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
10. Incubați 25 minute în incubator de microspecimene preîncălzit, la 57 °C.
11. Plasați placa CAP1 MIDI 2 minute pe un suport magnetic.
12. Țineți placa pe suportul magnetic. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.



ATENȚIE

Treceți imediat la pasul următor ([Spălare la pagina 62](#)). Nu lăsați peleta cu bile fără lichid prea mult timp.

Spălare

1. Spălați bilele după cum urmează.
 - a. Luați placa CAP1 MIDI de pe suportul magnetic.
 - b. Adăugați câte 200 µl EEW în fiecare godeu.
 - c. Utilizați o pipetă cu volumul setat la 150 µl și mixați prin pipetare de cel puțin 10 ori. Asigurați-vă că toate bilele sunt resuspendate.
Asigurați-vă că nu există pelete cu bile aspirând atent toată soluția cu bile din godeu în vârful de pipetă. Inspectați vizual partea inferioară a fiecărui godeu. Dacă este prezentă o paletă cu bile, orientați vârful de pipetă oblic spre aceasta în timpul pasului de spălare pentru a o disloca. Asigurați-vă că peleta cu bile este scufundată complet în soluție. Soluția ar trebui să aibă culoarea maro închis și consistență omogenă.
 - d. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP1 MIDI.
 - e. Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
 - f. Agitați 4 minute la 1800 rpm.
 - g. Incubați 5 minute în incubator de microspecimene, la 57 °C.
 - h. Plasați placa PAC1 MIDI 2 minute pe un suport magnetic.
 - i. Țineți placa pe suportul magnetic. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.
2. Spălați bilele a **doua** oară.
3. Spălați bilele a **treia** oară.
4. Utilizați o pipetă cu vârfuri fine pentru a îndepărta EEW rezidual din fiecare godeu.

Eluare

1. Luați placa CAP1 MIDI de pe suportul magnetic.
2. Mixați amestecul de eluare EE2 + HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

3. Adăugați cu grijă câte 17 µl de amestec de eluare EE2 + HP3 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP1 MIDI.
4. Eliminați restul de amestec de eluare EE2 + HP3.
5. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP1 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
6. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
7. Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
8. Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu ELU1 (eluare 1).
9. Mixați ET2 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
10. Adăugați câte 5 µl de ET2 în fiecare godeu corespondent de bibliotecă al noii plăci ELU1 PCR.
11. Transferați atent 15 µl de eluat din fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP1 MIDI în godeurile corespondente ale plăcii ELU1 PCR.
12. Eliminați placa CAP1 MIDI goală.
13. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa ELU1 PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
14. Agitați 2 minute la 1200 rpm.
15. Redepozitați EEW.

Configurare, a doua hibridizare

Acest pas leagă a doua oară zonele țintă ale bibliotecilor cADN și/sau gADN concentrate cu sondele de captare. A doua hibridizare asigură specificitatea ridicată a zonelor captate. Pentru a asigura concentrarea optimă a bibliotecilor, efectuați a doua hibridizare la 57 °C, timp de minimum 1,5 ore și maximum 4 ore.

Pregătirea

1. Pregătiți următorii reactivi.
 - TCB1 - Încălziți tubul 5 minute la 37 °C. Mixați în agitator vortex 10 minute și apoi centrifugați scurt.
 - TCA1 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - OPR1 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - OPD2 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Procedura

1. Verificați dacă TCB1 prezintă precipitare. Dacă prezintă precipitare, reîncălziți și agitați în agitator vortex până la dizolvarea cristalelor.
2. Adăugați câte 15 µl de TCB1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii ELU1 PCR.
3. Adăugați câte 10 µl TCA1 în fiecare godeu pentru bibliotecă.

4. Adăugați aceeași sondă utilizată în timpul primei hibridizări în fiecare godeu. Adăugați câte un set de sonde per godeu.
Nu combinați tipuri de sonde diferite.
 - **[Godeuri de bibliotecă ARN]**—Adăugați 5 µl OPR1 (capac roșu) în fiecare bibliotecă derivată din ARN.
 - **[Godeuri de bibliotecă ADN]**—Adăugați 5 µl OPD2 (capac alb) în fiecare bibliotecă derivată din ADN.
5. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa ELU1 PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
6. Agitați 2 minute la 1200 rpm.
7. Introduceți în ciclorul termic și rulați programul HYB2.
Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
8. Hibridizați între minimum 1,5 ore și maximum 4 ore la 57 °C.
9. Redepozitați reactivii de hibridizare.

Captură, a doua țintă

Acest pas utilizează SMB pentru captarea de sonde hibridizate pe zonele de interes țintă. Bilele se spală o dată cu RSB. Bibliotecile concentrate sunt eluate cu amestec de eluare EE2 + HP3 proaspăt preparat și neutralizate cu ET2.

Pregătirea

1. Preîncălziți un incubator de microspecimene cu un bloc termic MIDI la 57 °C.
2. Pregătiți următorii reactivi.
 - EE2 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - HP3 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - SMB - Aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
Utilizați **SMB**, nu SPB, pentru această procedură.
 - RSB - Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
 - ET2 - Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
3. Preparați amestec de eluare EE2 + HP3 într-un tub de microcentrifugare.

Tabelul 30 Amestec de eluare EE2+HP3 pentru captare, a doua țintă*

Componente, amestec de eluare	4 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Tabelul include și volumele excedentare. Consultați [Manipularea reactivilor la pagina 34](#), pentru calcule.

4. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp. Lăsați deoparte pentru pasul [Eluare la pagina 66](#).
5. Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri CAP2 (captare 2).
6. Pregătiți magnetul.

Procedura

Legare

1. Scoateți placa ELU1 PCR din ciclul termic.
2. Centrifugați placa ELU1 PCR 1 minut la 280 x g.
3. Mixați SMB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
Dacă există precipitat sau peleta de picături, asigurați-vă că ați atins temperatura camerei, pipetați în sus și în jos pentru a elibera peleta, apoi agitați pentru a o suspenda din nou.
4. Adăugați imediat câte 150 µl de SMB în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP2 MIDI.
Dacă distribuiți SMB cu canal, includeți un factor de excident de 1,15 la alicotare pentru a permite material suficient pentru specimen.
5. Eliminați toate resturile de materiale după ce ați adăugat SMB în fiecare godeu.
6. Configurați pipeta la 50 µl și transferați întregul volum din fiecare bibliotecă din placa ELU1 PCR în godeul corespondent al plăcii CAP2 MIDI.
7. Eliminați placa ELU1 PCR goală.
8. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
9. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
10. Incubați 25 minute în incubator de microspecimene, la 57 °C.
Dacă continuați în aceeași zi cu pasul [Amplificarea bibliotecii concentrate la pagina 68](#), urmați instrucțiunile de decongelare a reactivilor din secțiunea [Pregătirea pentru protocol](#).
11. Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
12. Luați placa CAP2 MIDI de pe suportul magnetic. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.



ATENȚIE

Treceți imediat la pasul următor ([Spălare la pagina 65](#)). Nu lăsați peleta cu bile fără lichid prea mult timp.

Spălare

1. Luați placa CAP2 MIDI de pe suportul magnetic.
2. Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
3. Adăugați câte 200 µl RSB în fiecare godeu.

4. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
5. Agitați 4 minute la 1800 rpm.
6. Plasați placa 2 minute pe suportul magnetic.
7. Țineți placa pe suportul magnetic. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.
8. Utilizați o pipetă cu vârfuri fine pentru a îndepărta RSB rezidual din fiecare godeu.

Eluare

1. Luați placa CAP2 MIDI de pe suportul magnetic.
2. Mixați amestecul de eluare EE2 + HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
3. Adăugați câte 22 µl de amestec de eluare EE2 + HP3 în fiecare godeu al plăcii CAP2 MIDI.
4. Eliminați restul de amestec de eluare EE2 + HP3.
5. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa CAP2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
6. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
7. Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
8. Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu ELU2 (eluare 2).
9. Mixați ET2 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
10. Adăugați câte 5 µl de ET2 în fiecare godeu corespondent de bibliotecă al noii plăci ELU2 PCR.
11. Transferați atent 20 µl de eluat din fiecare godeu de bibliotecă al plăcii CAP2 MIDI în godeurile corespondente ale plăcii ELU2 PCR.
12. Eliminați placa CAP2 MIDI goală.
13. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa ELU2 PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
14. Agitați 2 minute la 1200 rpm.
15. Redepozitați SMB, EE2, HP3, RSB și ET2.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, centrifugați placa ELU2 PCR 1 minut la 280 x g și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 7 zile.

Pregătirea pentru protocol

Această pregătire este necesară pentru a efectua pașii protocolului înainte de următorul punct de oprire sigur.

1. Pregătiți o găleată cu gheață sau un echivalent.
2. Scoateți tuburile de reactivi din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabelul 31 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congelăți) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
PPC3	între -25 °C și -15 °C	Decongealați la temperatura ambiantă.	Amplificarea bibliotecii concentrate
EPM	între -25 °C și -15 °C	A se păstra la rece.	Amplificarea bibliotecii concentrate

Tabelul 32 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerat) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
SPB (etichetă verde deschis)	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Purificarea bibliotecii concentrate amplificate
RSB	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Purificarea bibliotecii concentrate amplificate Pregătire pentru secvențiere

Amplificarea bibliotecii concentrate

În acest pas se utilizează primeri pentru amplificarea bibliotecilor concentrate.

Pregătirea

1. Dacă placa ELU2 a fost depozitată, decongealați-o la temperatura ambiantă și centrifugați-o 1 minut la 280 x g.

Procedura

1. Mixați PPC3 în agitator vortex, apoi centrifugați scurt.
2. Adăugați câte 5 µl de PPC3 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii ELU2 PCR.
3. Mixați EPM în agitator vortex 5 secunde, apoi centrifugați scurt.
4. Adăugați câte 20 µl EPM în fiecare godeu de bibliotecă.
5. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa ELU2 PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
6. Agitați 2 minute la 1200 rpm.
7. Introduceți în ciclul termic și rulați programul EL-PCR.
Consultați [Programarea cicloarelor termice la pagina 42](#).
Dacă continuați cu pasul [Normalizarea bibliotecilor la pagina 71](#), urmați instrucțiunile de decongelare din secțiunea [Pregătirea pentru protocol](#).
8. Redepozitați PPC3 și EPM.

Purificarea bibliotecii concentrate amplificate

În acest pas se utilizează SPB pentru purificarea bibliotecilor concentrate amplificate de compuși de reacție nedoriți. Bilele se spală de două ori cu etanol 80% proaspăt preparat. Pentru eluarea bibliotecilor se folosește RSB.

Pregătirea

1. Pregătiți următorii reactivi.
 - SPB - Aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute. Utilizați **SPB**, nu SMB, pentru această procedură.
 - RSB - Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
2. Preparați etanol 80% proaspăt într-o eprubetă conică de 15 ml sau 50 ml.

Tabelul 33 Preparați etanol 80% proaspăt

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

3. Mixați EtOH 80% proaspăt preparat în agitator vortex.
4. Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri BIND2 (purificare legare).
5. Pregătiți magnetul.

Procedura

Legare

1. Scoateți placa ELU2 PCR din ciclul termic.
2. Centrifugați placa ELU2 PCR 1 minut la 280 x g.
3. Mixați SPB 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
4. Adăugați imediat câte 110 µl de SPB în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii BIND2 MIDI.
5. Transferați 50 µl din fiecare bibliotecă din placa ELU2 PCR în godeul corespunzător al plăcii BIND2 MIDI.
6. Eliminați placa ELU2 PCR goală.
7. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BIND2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
8. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
9. Incubați la temperatura ambiantă timp de 5 minute.
10. Plasați placa BIND2 MIDI pe un suport magnetic timp de 5 minute.
11. Țineți placa pe suportul magnetic. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.

Spălare

1. Spălați bilele după cum urmează.
 - a. Mențineți placa BIND2 MIDI pe suportul magnetic și adăugați 200 µl de EtOH 80% proaspăt preparat în fiecare godeu.
 - b. Așteptați 30 de secunde.
 - c. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.
2. Spălați bilele a **două** oară.
3. Utilizați o pipetă cu vârful fine pentru a îndepărta EtOH rezidual din fiecare godeu.
4. Eliminați EtOH 80% neutilizat.

Eluare

1. Îndepărtați placa BIND2 MIDI de pe suportul magnetic.
2. Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
3. Adăugați câte 32 µl RSB în fiecare godeu de bibliotecă.
4. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BIND2 MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
5. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
6. Incubați la temperatura camerei timp de 2 minute.
7. Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
8. Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu PL (biblioteci purificate).
9. Transferați câte 30 µl de eluat din placa BIND2 MIDI în godeul corespunzător al plăcii PL PCR.
10. Eliminați placa BIND2 MIDI goală.
11. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa PL PCR.
12. Returnați SPB și redepozitați RSB.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți centrifugați placa PL PCR 1 minut la 280 x g și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 30 zile.

Pregătirea pentru protocol

Această pregătire este necesară pentru a efectua pașii protocolului înainte de următorul punct de oprire sigur.

1. Scoateți tuburile de reactivi din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabelul 34 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congelată) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
LNA1	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor
EE2	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor

Tabelul 35 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerat) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
LNB1	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.	Normalizarea bibliotecilor

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
HP3	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor Pregătire pentru secvențiere
LNW1	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor
LNS1	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Normalizarea bibliotecilor

2. Dacă continuați în aceeași zi cu pasul [Pregătire pentru secvențiere la pagina 75](#), urmați instrucțiunile de decongelare din secțiunea [Pregătirea pentru protocol](#).

Normalizarea bibliotecilor

Acest proces utilizează LNB1 și aditivi (LNA1) pentru normalizarea cantității din fiecare bibliotecă, asigurând, astfel, reprezentarea uniformă a bibliotecii respective în bibliotecile grupate. Bilele se spală de două ori cu LNW1. Bibliotecile sunt eluate cu amestec de eluare EE2 + HP3 proaspăt preparat și neutralizate cu LNS1.

Pregătirea

- Pregătiți următorii reactivi.
 - LNB1 - Aduceți bilele la temperatura ambiantă timp de 30 de minute.
 - LNA1 - Mixați în agitator vortex.
 - EE2 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - HP3 - Mixați în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
 - LNW1 - Mixați în agitator vortex. Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
 - LNS1 - Mixați în agitator vortex. Lăsați deoparte pentru utilizare în cadrul procedurii.
- Mixați LNB1 1 minut în agitator vortex pentru a resuspenda bilele.
Răsturnați tubul LNB1 pentru a vă asigura că toate bilele sunt resuspendate.
- Utilizați un set de pipetă de 800 µl pentru a pipeta și distribui LNB1 repetat de 10 ori pentru a asigura resuspendarea.
- Preparați imediat amestec principal LNA1 + LNB1 proaspăt într-un tub conic.



ATENȚIE

Resuspendați complet peleta cu bile LNB1 la fundul tubului pentru a preveni consecvența în densitatea clusterelor.

Tabelul 36 Amestec principal LNA1 + LNB1*

Componente, amestec principal	4 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Tabelul include și volumele excedentare. Consultați [Manipularea reactivilor la pagina 34](#), pentru calcule.

5. Agitați amestecul principal LNA1 + LNB1 în agitator vortex. Puneți deoparte pentru pasul de [Legare la pagina 72](#).
6. Preparați amestec de eluare EE2 + HP3 într-un tub de microcentrifugare.

Tabelul 37 Amestec de eluare EE2 + HP3 pentru normalizarea bibliotecilor*

Componente, amestec de eluare	4 biblioteci	8 biblioteci	16 biblioteci	24 biblioteci	48 biblioteci
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Tabelul include și volumele excedentare. Consultați [Manipularea reactivilor la pagina 34](#), pentru calcule.

7. Agitați amestecul de eluare în agitator vortex și apoi centrifugați scurt. Lăsați deoparte pentru pasul [Eluare la pagina 73](#).
8. Dacă placa PL PCR a fost depozitată, decongelați-o la temperatura ambiantă și centrifugați-o 1 minut la 280 x g. Mixați prin pipetare.
9. Etichetați o nouă placă MIDI cu 96 godeuri BBN (normalizare cu bile).
10. Pregătiți magnetul.

Procedura

Legare

1. Agitați amestecul principal LNA1 + LNB1 în agitator vortex.
2. Adăugați imediat 45 µl de amestec principal LNA1 + LNB1 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii BBN MIDI.
3. Eliminați restul de amestec principal LNA1 + LNB1.
4. Adăugați 20 µl din fiecare bibliotecă din placa PL PCR în godeul corespunzător al plăcii BBN MIDI.
5. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BBN MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
6. Agitați 30 minute la 1800 rpm.
7. Sigilați placa PL PCR cu folie autoadezivă și redepozitați-o.
8. Plasați placa BBN MIDI 2 minute pe un suport magnetic.
9. Țineți placa pe suportul magnetic. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.

Spălare

1. Spălați bilele după cum urmează.
 - a. Luați placa BBN MIDI de pe suportul magnetic.
 - b. Adăugați câte 45 µl LNWI în fiecare godeu pentru bibliotecă.
 - c. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BBN MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
 - d. Agitați 5 minute la 1800 rpm.
 - e. Plasați placa BBN MIDI 2 minute pe un suport magnetic.
 - f. Țineți placa pe suportul magnetic. Cu o pipetă configurată la 200 µl, scoateți și eliminați tot supernatantul din fiecare specimen, fără a perturba peleta cu bile.
2. Spălați bilele a *două* oară.
3. Utilizați o pipetă cu vârfuri fine pentru a îndepărta supernatantul rezidual din fiecare godeu.

Eluare

1. Luați placa BBN MIDI de pe suportul magnetic.
2. Mixați amestecul de eluare EE2 + HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
3. Adăugați 32 µl de EE2 + HP3 în fiecare godeu de bibliotecă al plăcii BBN MIDI.
4. Eliminați restul de amestec de eluare.
5. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa BBN MIDI.
Sigilați complet marginile și godeurile.
6. Agitați 2 minute la 1800 rpm.
7. Plasați 2 minute pe un suport magnetic.
8. Etichetați o nouă placă PCR cu 96 godeuri cu NL (biblioteci normalizate).
9. Transferați atent 30 µl de eluat din fiecare godeu de bibliotecă al plăcii BBN MIDI în godeurile corespondente ale plăcii NL PCR.



ATENȚIE

Dacă ați aspirat bile în vârfurile de pipetă, returnați bilele în placa pe suportul magnetic și așteptați să se limpezească lichidul (cca. 2 minute) înainte de a trece la următorul pas al procedurii.

10. Eliminați placa BBN MIDI goală.
11. Mixați LNS1 în agitator vortex.
12. Adăugați câte 30 µl de LNS1 în fiecare godeu de bibliotecă al noii plăci NL PCR.
13. Mixați prin pipetare de cinci ori.
14. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa NL PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile.
15. Redepozitați LNB1, LNA1, EE2, LNWI și LNS1.

PUNCTUL DE OPRIRE ÎN SIGURANȚĂ

Dacă vă opriți, centrifugați placa NL PCR 1 minut la 280 x g și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 32 zile.

Pregătirea pentru protocol

Această pregătire este necesară pentru a efectua pașii protocolului înainte de secvențiere.

Începeți prepararea consumabilelor de secvențiere din kitul NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cicluri) (PN 20028871) cu cel puțin o oră înainte de utilizare.

1. Îndepărtați tamponul de diluție bibliotecă (HT1) din spațiul de depozitare de la -25 °C la -15 °C. Decongelați la temperatura ambiantă. După decongelare, păstrați la rece.
2. Urmați instrucțiunile de pregătire din *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (nr. document 1000000009513) pentru alte consumabile din set.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cicluri)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cicluri)
3. Scoateți tuburile de reactivi din cutie și urmați instrucțiunile de decongelare.

Tabelul 38 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (congealați) (PN 20031121)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
Control intern PhiX (PX3 sau PhiX)	între -25 °C și -15 °C	Decongelați la temperatura ambiantă. După decongelare, păstrați la rece.	Pregătire pentru secvențiere

Tabelul 39 Cutie TruSight Oncology Comp Enrichment (refrigerat) (PN 20031123)

Reactiv	Depozitare	Instrucțiuni de decongelare	Pas din protocol
HP3	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Pregătire pentru secvențiere
RSB (etichetă roz)	între 2 °C și 8 °C	Aduceți la temperatura ambiantă.	Pregătire pentru secvențiere

Pregătire pentru secvențiere

Fiecare ciclu de secvențiere ADN și ARN trebuie să includă un control și un NTC. NTC pentru ADN și ARN sunt secvențiate repetat, după necesități, astfel încât fiecare ciclu să includă un NTC. Fiecare ciclu ADN și ARN include un control pozitiv separat.

Pregătirea

1. Consultați recomandările din [Număr de biblioteci și selectarea indecșilor la pagina 36](#).

2. Etichetați un tub de microcentrifugare cu dHP3 (HP3 diluat).
3. Etichetați un tub de microcentrifugare cu dPhiX (PhiX diluat).
4. Preîncălziți un bloc termic la 96 °C pentru tuburile de microcentrifugare.
5. Pregătiți o găleată cu gheață sau un echivalent.

Diluarea și denaturarea controlului PhiX

1. Mixați HP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
2. Combinați în tubul de microcentrifugare dHP3 următoarele volume:
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Mixați dHP3 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
4. Mixați RSB prin răsturnare sau în agitator vortex.
5. Mixați Control PhiX în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
6. Combinați în tubul de microcentrifugare dPhiX următoarele volume:
 - 8 µl RSB
 - 2 µl control PhiX
7. Adăugați 10 µl dHP3 în tubul dPhiX.
8. Eliminați tubul dHP3.
9. Mixați dPhiX în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
10. Incubați dPhiX 5 minute la temperatura ambiantă pentru denaturare.
11. Mixați HT1 în agitator vortex.
12. Adăugați mediat 980 µl HT1 prerăcit la dPhiX.
13. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.
14. Puneți PhiX la rece până la utilizarea în prepararea celei de-a doua diluții.
Concentrația finală este 20 pM dPhiX.
15. Redepozitați PhiX, HP3 și RSB.

Grupare și denaturare a bibliotecilor pentru TSO Comprehensive (UE)

1. Dacă placa NL PCR a fost depozitată, decongelați-o la temperatura ambiantă și centrifugați-o 1 minut la 280 x g.
2. Cu o pipetă multicanal setată la 30 µl, mixați atent prin pipetare de cinci ori bibliotecile în placa NL PCR. Utilizați vârfuri de pipetă noi pentru fiecare bibliotecă.



ATENȚIE

Mixați temeinic bibliotecile pentru performanțe optime.

3. Selectați una dintre opțiunile de mai jos pentru grupare, denaturare și diluare de biblioteci.

- **[Opțiunea 1]** Secvențiați simultan biblioteci derivate din specimene ARN și ADN. Consultați [Opțiunea 1: Biblioteci ADN și ARN împreună la pagina 77](#).
- **[Opțiunea 2]** Secvențiați doar biblioteci derivate din specimene ADN. Consultați [Opțiunea 2: Biblioteci exclusiv ADN la pagina 78](#).
- **[Opțiunea 3]** Secvențiați doar biblioteci derivate din specimene ARN. Consultați [Opțiunea 3: Biblioteci exclusiv ARN la pagina 79](#).

Opțiunea 1: Biblioteci ADN și ARN împreună

1. Etichetați un tub de microcentrifugare cu PRL (biblioteci ARN grupate).
2. Etichetați un tub de microcentrifugare cu PDL (biblioteci ADN grupate).
3. Transferați câte 10 µl din fiecare bibliotecă ARN (cADN) normalizată din placa NL în tubul PRL. Nu grupați două biblioteci cu același primer de indexare.
4. Transferați câte 10 µl din fiecare bibliotecă ADN normalizată din placa NL în tubul PDL. Nu grupați două biblioteci cu același primer de indexare.
5. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa NL PCR. Sigilați complet marginile și godeurile.
6. Mixați tuburile PRL și PDL în agitator vortex.
7. Centrifugați scurt tuburile PRL și PDL.
8. Incubați tuburile PRL și PDL 2 minute în bloc termic, la 96 °C.
9. Păstrați tuburile PRL și PDL la rece timp de 5 minute.
10. Mixați tuburile PRL și PDL în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
11. Păstrați tuburile PRL și PDL la rece.

Preparați prima diluție

1. Etichetați un tub de microcentrifugare cu DIL1 (diluția 1).
2. Transferați 20 µl PDL în tubul DIL1 gol.
3. Adăugați 5 µl PRL în tubul DIL1.
4. Eliminați tuburile PDL și tuburile PRL.
5. Adăugați 475 µl HT1 prerăcit în tubul DIL1 (diluție 1:20).
6. Mixați tubul DIL1 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Preparați a doua diluție

1. Etichetați un tub de microcentrifugare de 2,0 ml cu DIL2 (diluția 2).
2. Transferați 40 µl DIL1 în tubul DIL2 gol.
3. Eliminați tubul DIL1.

4. Adăugați 1660 µl HT1 prerăcit în tubul DIL2 (diluție 1:850).
5. Mixați în agitator vortex 20 pM dPhiX preparat și apoi centrifugați scurt.
6. Adăugați 2,5 µl 20 pM dPhiX preparat în tubul DIL2.
7. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.
8. Încărcați 1300 µl DIL2 în NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri) decongelat.
Pentru mai multe informații, consultați *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (nr. document 1000000009513).
9. Eliminați tubul DIL2.
10. Centrifugați placa NL PCR 1 minut la 280 x g și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 32 de zile.
11. Treceți la secvențiere.
Pentru mai multe informații, consultați *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (nr. document 1000000009513).

Opțiunea 2: Biblioteci exclusiv ADN

1. Etichetați un tub de microcentrifugare cu PDL (biblioteci ADN grupate).
2. Transferați câte 10 µl din fiecare bibliotecă ADN normalizată din placa NL în tubul PDL.
Nu grupați două biblioteci cu același primer de indexare.
3. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa NL PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile.
4. Mixați tubul PDL în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
5. Incubați tubul PDL 2 minute în bloc termic, la 96 °C.
6. Păstrați tubul PDL la rece timp de 5 minute.
7. Mixați tubul PDL în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
8. Păstrați tubul PDL la rece.

Preparați prima diluție

1. Etichetați un tub de microcentrifugare cu DIL1 (diluția 1).
2. Transferați 10 µl PDL în tubul DIL1 gol.
3. Eliminați tubul PDL.
4. Adăugați 190 µl HT1 prerăcit în tubul DIL1 (diluție 1:20).
5. Mixați DIL1 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Preparați a doua diluție

1. Etichetați un tub de microcentrifugare de 2,0 ml cu DIL2 (diluția 2).
2. Transferați 40 µl DIL1 în tubul DIL2 gol.

3. Eliminați tubul DIL1.
4. Adăugați 1660 µl HT1 prerăcit în tubul DIL2 (diluție 1:850).
5. Mixați în agitator vortex 20 pM dPhiX preparat și apoi centrifugați scurt.
6. Adăugați 2,5 µl 20 pM dPhiX preparat în tubul DIL2.
7. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.
8. Încărcați 1300 µl DIL2 în NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri) decongelat.
Pentru mai multe informații, consultați *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (nr. document 1000000009513).
9. Eliminați tubul DIL2.
10. Centrifugați placa NL PCR 1 minut la 280 x g și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 32 de zile.
11. Treceți la secvențiere.
Pentru mai multe informații, consultați *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (nr. document 1000000009513).

Opțiunea 3: Biblioteci exclusiv ARN

1. Etichetați un tub de microcentrifugare cu PRL (biblioteci ARN grupate).
2. Transferați câte 10 µl din fiecare bibliotecă ARN (cADN) normalizată din placa NL în tubul PRL.
Nu grupați două biblioteci cu același primer de indexare.
3. Aplicați folie autoadezivă de sigilare pe placa NL PCR.
Sigilați complet marginile și godeurile, pentru a preveni evaporarea.
4. Mixați tubul PRL în agitator vortex.
5. Centrifugați scurt tubul PRL.
6. Incubați tubul PRL 2 minute în bloc termic, la 96 °C.
7. Păstrați tubul PRL la rece timp de 5 minute.
8. Mixați tubul PRL în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.
9. Păstrați tubul PRL la rece.

Preparați prima diluție

1. Etichetați un tub de microcentrifugare cu DIL1 (diluția 1).
2. Transferați 10 µl PRL în tubul DIL1 gol.
3. Eliminați tubul PRL.
4. Adăugați 190 µl HT1 prerăcit în tubul DIL1 (diluție 1:20).
5. Mixați DIL1 în agitator vortex și apoi centrifugați scurt.

Preparați a doua diluție

1. Etichetați un tub de microcentrifugare de 2,0 ml cu DIL2 (diluția 2).
2. Transferați 40 µl DIL1 în tubul DIL2 gol.
3. Eliminați tubul DIL1.
4. Adăugați 1646 µl HT1 prerăcit în tubul DIL2 (diluție 1:843).
5. Mixați în agitator vortex 20 pM dPhiX preparat și apoi centrifugați scurt.
6. Adăugați 16,7 µl 20 pM dPhiX preparat în tubul DIL2.
7. Agitați pentru a amesteca, apoi centrifugați pentru scurt timp.
8. Încărcați 1300 µl DIL2 în NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cicluri) decongelat.
Pentru mai multe informații, consultați *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (nr. document 1000000009513).
9. Eliminați tubul DIL2.
10. Centrifugați placa NL PCR 1 minut la 280 x g și depozitați-o la o temperatură între -25 °C și -15 °C timp de până la 32 zile.
11. Treceți la secvențiere.
Pentru mai multe informații, consultați *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide* (nr. document 1000000009513).

Interpretarea rezultatelor

Rezultatele secvențierii obținute cu testul TSO Comprehensive (UE) sunt raportate individual pentru fiecare specimen, într-un raport PDF și unul JSON. De asemenea, la nivel de specimen, se generează și un raport de profunzime redusă (*LowDepthReport.tsv*).

La nivel de ciclu se generează următoarele fișiere de rezultate:

- *ControlOutput.tsv*
- *MetricsOutput.tsv*

Doar variantele care au corespuns la controlul calității apar în rapoartele PDF și JSON.

Pentru informații detaliate despre analiză, consultați *Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE)* (nr. document 200008661).

Rezultatele pentru diagnostic corelat

Pentru fiecare utilizare preconizată pentru diagnostic corelat (CDx) există trei posibile rezultate:

- **Pozitiv** - S-a detectat o variantă sau un biomarker și a fost clasificat la nivel 1 (CDx).
- **Nedetectabil** - Nu s-au detectat în specimen variante sau biomarkeri asociați cu utilizarea preconizată pentru CDx. Tipul de tumoare selectat pentru specimen este adecvat pentru CDx.

- **Fără rezultat** - Determinarea statusului variantelor este imposibilă din unul sau mai multe din următoarele motive:
 - Utilizarea preconizată pentru CDx a fost inaplicabilă pentru specimenul testat, deoarece tipul de tumoare selectat pentru specimen nu este adecvat pentru tipul de tumoare pentru CDx.
 - Ciclul de secvențiere nu a respectat specificațiile de control al calității.
 - Biblioteca nu a respectat specificațiile obligatorii de control al calității.
 - Nu a fost analizat acidul nucleic adecvat.

Toate rezultatele pentru utilizarea preconizată pentru CDx se raportează în secțiunea Rezultate pentru diagnostic corelat a raportului în format JSON. Doar utilizările preconizate cu rezultatele pozitive se raportează în secțiunea Rezultate pentru diagnostic corelat a raportului în format PDF.

Variante pentru analiza profilului tumoral

TSO Comprehensive (UE) a fost conceput pentru raportarea variantelor somatice cu relevanță clinică sau cu potențială relevanță clinică. Software-ul testului TSO Comprehensive (UE) utilizează un fond de cunoștințe (KB) care determină dacă fiecare variantă detectată și eligibilă ([Tabelul 2](#)) este relevantă sau potențial relevantă clinic, pe baza dovezilor de asocieri terapeutice, de diagnostic sau pronostic. KB ia în considerare și dacă asocierile au fost stabilite (sau nu) pentru tipul de tumoare testat. Suspiciunile și asocierile cu risc de cancer nu sunt incluse în KB. Sunt eliminate polimorfismele comune.

Pentru variantele pentru analiza profilului tumoral, rezultatele pozitive sunt clasificate în Rezultate genomice cu relevanță clinică dovedită (Nivel 2) sau Rezultate genomice cu potențială relevanță clinică (Nivel 3), conform KB și tipului de tumoare identificat.

Controlul calității eșuat duce la absența rezultatelor pentru tipurile de variante relevante pentru valoarea de control al calității eșuată. Consultați [Tabelul 40](#) și [Tabelul 41](#) pentru mai multe informații. Pozițiile de analiză a profilului tumoral cu profunzime insuficientă sunt prezentate în Raportul pentru profunzime redusă și nu în Raportul TSO Comprehensive (UE).

Controlul calității

- Pentru informații despre cuantificarea acidului nucleic și minimul de materiale introduse, consultați [Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28](#).
- Ciclurile de secvențiere și validitatea specimenelor sunt determinate automat și raportate de Modul de analiză TSO Comprehensive (UE). Pentru informații detaliate despre analiză, consultați *Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200008661)*.
- Raportul TSO Comprehensive (UE), disponibil în formatele PDF și JSON, rezumă rezultatele controlului calității. Fișierele cu rapoartele sunt stocate în folderul analizei. Consultați *Ghidul fluxului de lucru pentru*

Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200008661) pentru locația folderului analizei (conține rapoartele în format PDF și JSON) și a folderului de executare.

Tabelul 40 Valori CC rezultat raport TSO Comprehensive (UE)

Tip de rezultat	Metrică	Specificații	Descriere	Impactul eșecului de specificare*
Rulare de secvențiere	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Procentaj de citiri care respectă filtrele (PF).	Executarea secvențierii este invalidată. Nu s-au raportat rezultate pentru niciun specimen din rulare.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Procentaj mediu al definițiilor de baze cu scor de calitate mai mare sau egal cu Q30 pentru Citirea 1.	Executarea secvențierii este invalidată. Nu s-au raportat rezultate pentru niciun specimen din rulare.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Procentaj mediu al definițiilor de baze cu scor de calitate mai mare sau egal cu Q30 pentru Citirea 2.	

Tip de rezultat	Metrică	Specificații	Descriere	Impactul eșecului de specificare*
Biblioteci ADN	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 SAU > 3106 și $P_VALUE \leq 0,049$	Valoare prin care se evaluează potențialul de contaminare cu ajutorul VAF pentru variantele comune. Scorul contaminării se bazează pe distribuția VAF pentru SNP. Valoarea P de contaminare este utilizată pentru a evalua genomurile foarte rearanjate. Se aplică numai atunci când scorul de contaminare este peste limita superioară a specificațiilor.	Nu se raportează rezultate ADN.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Lungimea medie a fragmentelor din specimen.	Nu se raportează rezultate pentru TMB sau variante ADN scurte.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (număr)	≥ 150	Acoperirea fragmentelor de exoni în toate bazele cu exoni.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Procentajul de baze cu exoni cu acoperire 50X a fragmentelor.	
	USABLE_MSI_SITES (număr)	≥ 40	Numărul de locații MSI utilizabile pentru determinarea MSI (număr de locații microsatelitare cu suficiente citiri de anvergură pentru identificarea instabilității microsatelitare).	Nu se raportează rezultate MSI.
	COVERAGE_MAD (număr)	$\leq 0,210$	Media abaterilor absolute de la media valorilor normalizate pentru fiecare zonă țintă CNV.	Nu se raportează rezultate pentru amplificarea de gene.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (număr)	$\geq 1,0$	Numărul mediu brut din interval/țintă CNV.	

Tip de rezultat	Metrică	Specificații	Descriere	Impactul eșecului de specificare*
Biblioteci ARN	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Lungimea medie a fragmentelor din specimen.	Nu se raportează rezultate pentru fuziune sau variantele cu splice.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (coeficient)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X este o unitate de măsură a uniformității acoperirii. Pentru fiecare genă cu acoperire minimă 500x, se calculează coeficientul de variație al acoperirii pentru întreaga genă. Această valoare reprezintă media respectivelor valori. O valoare ridicată indică un nivel ridicat de variație, indicând, totodată, o problemă la pregătirea bibliotecii, cum sunt aportul redus de specimen și/sau probleme de alimentare la sondă. Această valoare se calculează pe baza tuturor citirilor (inclusiv cele marcate ca duplicate).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (număr)	$\geq 9.000.000$	Numărul total de citiri pentru maparea zonelor țintă. Această valoare se calculează pe baza tuturor citirilor (inclusiv cele marcate ca duplicate).	

* Rezultatele reușite prezintă mesajul PASS (reușită).

Tabelul 41 Valori de control rezultat raport TSO Comprehensive (UE)

Tip de rezultat	Metrică	Specificații	Impactul eșecului de specificare*
Control pozitiv	Control ADN extern	23 din 24 variante specificate detectate	Invalidați manual probele pacienților pe baza rezultatelor probelor de control. Software-ul modulului de analiză nu invalidează automat probele pacienților pe baza rezultatelor probelor de control.
	Control extern ARN	12 din 13 variante specificate detectate	
Control fără șablon	Acoperire exon medie ADN pentru TSO Comprehensive (UE)	≤ 8	Invalidați manual probele pacienților pe baza rezultatelor probelor de control. Software-ul modulului de analiză nu invalidează automat probele pacienților pe baza rezultatelor probelor de control.
	Genă ARN peste valoarea limită medie	≤ 1	

* Rezultatele reușite prezintă mesajul PASS (reușită).

- Repetați ciclurile de secvențiere nevalide.
- Repetați testarea bibliotecilor cu următoarele rezultate:
 - Biblioteci ADN contaminate
 - Biblioteci ARN nevalide
 - Testele pot fi repetate pentru a obține mai multe variante sau rezultatele biomarkerilor pentru bibliotecile ADN devalidate pentru un tip de variantă, dar nu pentru toate.
- Se evaluează controalele pozitive pentru definirea de variante. Dacă controalele pozitive nu respectă specificațiile pentru definirea de variante, devalidați manual ciclul de secvențiere. Software-ul modulului de analiză nu invalidează automat probele pacienților pe baza rezultatelor probelor de control.
- NTC sunt evaluate comparativ cu acoperirea medie pentru exoni pentru ADN și pentru gene peste valoarea limită medie pentru ARN. Dacă controalele negative nu respectă specificațiile, devalidați manual evenimentul de pregătire a bibliotecii și toate ciclurile de secvențiere asociate. Software-ul modulului de analiză nu invalidează automat probele pacienților pe baza rezultatelor probelor de control.
- Efectuați acțiuni de control al calității conforme cu reglementările sau cerințele de acreditare locale, regionale și/sau naționale.

Pentru informații suplimentare despre repetarea ciclurilor de secvențiere pentru biblioteci, consultați [Depanare la pagina 86](#).

Depanare

Pentru depanarea problemelor din fluxul de lucru, urmați instrucțiunile din tabelul de mai jos. Dacă o rulare de secvențiere sau o pregătire a bibliotecii pentru o probă eșuează de două ori, este necesară o depanare suplimentară. Contactați Departamentul de asistență tehnică Illumina.

Observație	Cauză posibilă	Acțiune recomandată
Ciclul de secvențiere nu corespunde specificațiilor de control al calității.	- Eroare de grupare - Eroare de diluție - Denaturare incompletă la căldură a PRL/PDL - Probleme cu pregătirea consumabilelor de secvențiere (de exemplu, nedezghețate adecvat, condens/reziduuri pe celula de flux)	Resecvențiați bibliotecile de pe placa PCR pentru biblioteci normalizate (NL). Consultați Pregătire pentru secvențiere la pagina 75.
	- Utilizare incorectă a sondelor de îmbogățire (de exemplu, sondele OPR1 utilizate pentru specimene ADN, sondele OPD2 utilizate pentru specimene ARN) - Eroare în fluxul de lucru de pregătire a bibliotecii în timpul sau după primul pas de hibridizare.	Reconcentrați bibliotecile de pe placa PCR pentru biblioteci amplificate (ALS). Consultați Configurare, prima hibridizare la pagina 58 .
	Cerințe pentru introducerea specimenului nerespectate	Inițializați pregătirea bibliotecii de la începutul fluxului de lucru. Consultați Denaturare și renaturare ARN la pagina 44 sau Fragmentare gADN la pagina 49 .
	Eroare în fluxul de lucru de pregătire a bibliotecii în timpul sau înainte de indexarea pasului PCR	Reconcentrați bibliotecile de pe placa PCR pentru biblioteci amplificate (ALS). Consultați Configurare, prima hibridizare la pagina 58 .

Observație	Cauză posibilă	Acțiune recomandată
Eroare la generarea rapoartelor sau eroare generală a secvențiatorului (de ex., eroare de rețea, eroare la încărcarea/descărcarea reactivilor etc.)	Problemă cu instrumentul	Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina.
	Problemă cu software-ul sau instrumentul.	Consultați Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE) (nr. document 200008661) pentru asistență privind generarea rapoartelor. Contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru asistență suplimentară.
Biblioteca ADN nu respectă specificațiile de control al calității.	Cerințe pentru introducerea specimenului nerespectate.	Asigurați introducerea corectă a specimenului și repetați pregătirea bibliotecii de la pasul Fragmentare gDNA. Consultați Cerințe privind speciemenele la pagina 27 , și Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28 .
	Eroare de utilizare sau de echipament în fluxul de lucru de analiză.	Repetăți pregătirea bibliotecii de la unul din pașii următori, în funcție de momentul în care suspectați că s-a produs eroarea de utilizare sau de echipament. Dacă pasul este necunoscut sau au apărut alte erori, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru depanare. • Resecvențiați bibliotecile de pe placa PCR pentru biblioteci normalizate (NL). Consultați Pregătire pentru secvențiere la pagina 75. • Reconcentrați bibliotecile de pe placa PCR pentru biblioteci amplificate (ALS). Consultați Configurare, prima hibridizare la pagina 58. • Inițializați pregătirea bibliotecii de la începutul fluxului de lucru. Consultați Fragmentare gADN la pagina 49.

Observație	Cauză posibilă	Acțiune recomandată
	Criteriile parametrilor CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE neîntrunite.	Consultați Avertismente și precauții pentru informații despre evitarea contaminării încrucișate. Revizuiți configurația plăcii și indexarea bibliotecii pentru a vă asigura că nu s-au secvențiat biblioteci cu același index împreună. Pentru bibliotecile afectate, inițializați pregătirea bibliotecii de la începutul fluxului de lucru. Consultați Fragmentare gADN la pagina 49. Posibilă contaminare apărute în timpul extracției specimenului. E posibil să fie necesară repetarea extracției pentru a asigura necontaminarea specimenului.
	MSI utilizabilă eșuată.	Consultați setările de utilizare și operare ale producătorului pentru baia cu ultrasunete (inclusiv nivelul apei și tipurile de tuburi). Asigurați-vă că ați introdus în analiză specimenul corect. Consultați Cerințe privind speciemenele la pagina 27, și Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28. E posibil să fie necesară repetarea extracției specimenului și/sau a pasului Fragmentare gADN dacă specimenul a fost fragmentat excesiv sau deteriorat.

Observație	Cauză posibilă	Acțiune recomandată
	E posibil ca specimenul să fie fragmentat excesiv sau ca acidul nucleic să fie deteriorat, afectând capacitatea de generare de biblioteci unice suficiente.	Consultați Setările de configurare a băii cu ultrasunete pentru fragmentarea ADN-ului la pagina 23 și setările producătorului băii cu ultrasunete pentru utilizare și operare (inclusiv nivelul apei și tipul tubului). Asigurați-vă că ați introdus în analiză specimenul corect. Consultați Cerințe privind speciemenele la pagina 27, și Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28. E posibil să fie necesară repetarea extracției specimenului și/sau a pasului Fragmentare gADN dacă specimenul a fost fragmentat excesiv sau deteriorat.
Biblioteca ARN nu respectă specificațiile de control al calității.	Cerințe pentru introducerea specimenului nerespectate.	Asigurați introducerea corectă a specimenului și repetați pregătirea bibliotecii de la pasul Denaturare și renaturare ARN. Consultați Cerințe privind speciemenele la pagina 27, și Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28.
	Eroare de utilizare sau de echipament în fluxul de lucru de analiză.	Repetăți pregătirea bibliotecii de la unul din pașii următori, în funcție de momentul în care suspectați că s-a produs eroarea de utilizare sau de echipament. Dacă pasul este necunoscut sau au apărut alte erori, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru depanare. • Resecvențiați bibliotecile de pe placa PCR pentru biblioteci normalizate (NL). Consultați Pregătire pentru secvențiere la pagina 75. • Repetați pașii de reconcentrare a bibliotecilor de pe placa PCR pentru biblioteci amplificate (ALS). Consultați Configurare, prima hibridizare la pagina 58. • Inițializați pregătirea bibliotecii de la începutul fluxului de lucru. Consultați Denaturare și renaturare ARN la pagina 44.

Observație	Cauză posibilă	Acțiune recomandată
	E posibil ca specimenul să fi fost fragmentat excesiv sau ca acidul nucleic să fie deteriorat, afectând capacitatea de generare de biblioteci unice suficiente.	Asigurați-vă că ați introdus specimenul corect. Consultați Cerințe privind speciemenele la pagina 27 , și Extracția, cuantificarea și depozitarea acidului nucleic la pagina 28 . E posibil să fie necesară repetarea extracției unui nou specimen dacă specimenul este fragmentat excesiv sau deteriorat.
Control pozitiv eșuat (ADN/ARN).	Cerințe pentru introducerea specimenului pentru controlul pozitiv nerespectate.	Asigurați-vă că ați introdus în analiză specimenul corect. Revizuiți configurația plăcii și asigurați-vă că ați introdus reactivii corecți (sonde, indecși) în godeurile corecte. Asigurați-vă că ați depozitat probele de control pozitive conform etichetei. Pentru toate probele cu control pozitiv, repetați pregătirea bibliotecii de la unul din pașii următori, în funcție de momentul în care suspectați că s-a produs eroarea de utilizare sau de echipament. Dacă pasul este necunoscut sau au apărut alte erori, contactați departamentul de Asistență tehnică Illumina pentru depanare.
	Eroare de utilizare sau de echipament în fluxul de lucru de analiză.	• Resecvențiați bibliotecile de pe placa PCR pentru biblioteci normalizate (NL). Consultați Pregătire pentru secvențiere la pagina 75. • Reconcentrați bibliotecile de pe placa PCR pentru biblioteci amplificate (ALS). Consultați Configurare, prima hibridizare la pagina 58. • Inițializați pregătirea bibliotecii de la începutul fluxului de lucru. Consultați Denaturare și renaturare ARN la pagina 44 sau Fragmentare gADN la pagina 49.

Observație	Cauză posibilă	Acțiune recomandată
NTC eșuat (ADN/ARN).	Contaminare încrucișată sau contaminare a zonei de lucru.	Consultați secțiunea Avertismente și precauții pentru informații despre decontaminarea zonelor de lucru și evitarea contaminării încrucișate. Revizuiți configurația plăcii și indexarea bibliotecii pentru a vă asigura că nu s-au secvențiat biblioteci cu același index împreună. Repetati pregătirea bibliotecilor de la începutul fluxului de lucru pentru toate bibliotecile cu control fără șablon.
	Indexare incorectă a bibliotecii.	
Software-ul indică neincluderea controalelor pozitive și/sau negative în ciclul de secvențiere.	Repartizarea incorectă a tipului de cancer în planificarea ciclului Local Run Manager.	Retrimiteri în coadă analiză cu controale identificate corect, conform instrucțiunilor din Ghidul fluxului de lucru pentru modulul de analiză (consultați <i>Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE)</i> (nr. document 200008661)).

Caracteristici de performanță

TSO Comprehensive (UE) este un panou NGS ținut care detectează modificările la 517 gene. Variante ADN scurte (mononucleotidice [SNV], multinucleotidice [MNV], inserții și deleții) sunt eligibile pentru raportare pentru toate cele 517 gene. Povara mutațională tumorală este raportată ca scor pe baza unui număr de variante somatice non-somatice per megabază (consultați *Ghidul fluxului de lucru pentru Local Run Manager pentru modulul de analiză TruSight Oncology Comprehensive (UE)* (nr. document 200008661) pentru detalii). MSI este raportată ca stare. Sunt eligibile pentru raportare amplificări de gene pentru genele MET și ERBB2. Fuziunile sunt eligibile pentru raportare din cele 23 de gene indicate în [Rezumatul și explicarea testului la pagina 1](#). Sunt eligibile pentru raportare variante splice pentru genele MET și EGFR. Pentru raportare, variantele trebuie să fie detectate, să fie prezente în KB pentru testul TSO Comprehensive (UE) și să fie eligibile în funcție de tipul de țesut testat. Pentru raportare, fuziunile NTRK necesită partener de fuziune 5' și domeniu NTRK-kinază intact. Pentru variantele ADN scurte, s-a efectuat o abordare a validării reprezentativă pentru genele ținute din grup, cu date reprezentând SNV, MNV, inserții și deleții. Pentru amplificări de gene, fuziuni și variante splice s-a efectuat testare la nivel de gene. S-au evaluat, dacă a fost indicat, TMB și MSI. Pentru ipotezele Cdx pentru fuziune NTRK, s-au testat fuziuni în specimene FFPE în studii centrate pe performanțe specifice ipotezei (cum sunt limita de detecție, precizia intra-laborator, reproductibilitatea, precizia și performanța clinică).

[Tabelul 42](#) prezintă definițiile valorilor calculate în diverse studii.

Tabelul 42 Definițiile valorilor

Termen	Definiție
Acord procentual pozitiv (PPA)	Procentajul de rezultate pozitive identificat corect din totalul rezultatelor pozitive, comparativ cu o metodă ortogonală .
Acord procentual negativ (NPA)	Procentajul de rezultate negative identificat corect din totalul rezultatelor pozitive, comparativ cu o metodă ortogonală.
Acord procentual total (OPA)	Procentajul de rezultate negative și pozitive identificat corect din totalul rezultatelor observate, comparativ cu o metodă ortogonală.
Procentaj detecție pozitivă (PPC)	Procentajul de rezultate observate pozitive pentru o țintă din rezultatele scontate a fi pozitive pentru țintă .
Procentaj detecții negative (PNC)	Procentajul de rezultate observate negative pentru o țintă din rezultatele scontate a fi negative pentru țintă .
n/N	Numărul de observații pozitive sau negative (n) împărțit la numărul total de observații (N) pentru calcularea PPC sau respectiv a PNC. Valorile n și N pot fi la niveluri diferite (de ex., variantă sau genă) sau combinate într-un grup (de ex., SNV).
Abatere standard (AS)	O măsură a valorii variației valorilor unei variabile în jurul mediei acesteia.
Coeficient procentual de variație (CV%)	Deviația standard împărțită la medie ca procent.

Contaminarea încrucișată

Studiul privind contaminarea încrucișată a fost efectuat pentru a evalua dacă există rezultate fals pozitive cauzate de contaminarea între godeuri în timpul pregătirii bibliotecii de specimene sau de contaminarea între ciclurile de secvențiere consecutive. Această analiză a fost efectuată pentru variante mici de ADN (care afectează și TMB), fuziuni, amplificări ale genelor și MSI. Au fost preparate biblioteci din specimene caracterizate într-o dispunere tip tablă de șah cu specimene alternante, pentru a evalua contaminarea între godeuri, și cu indecși alternanți, pentru a evalua contaminarea între cicluri de secvențiere consecutive, efectuate pe același Instrumentul NextSeq 550Dx. Studiul privind contaminarea încrucișată a indicat un număr de zero evenimente de contaminare observate prin examinarea variantelor detectate pentru fiecare specimen, fără detectare de rezultate fals pozitive.

Pentru testul TSO Comprehensive (UE) au fost concepuți doi indicatori CC (CONTAMINATION_SCORE și P_VALUE) pentru a detecta contaminarea specimenelor ADN. S-a evaluat sensibilitatea la detectarea contaminării. Specimenele de ADN tumoral FFPE au fost amestecate cu diferite cantități de specimene de ADN normal FFPE pentru a se obține în mod deliberat probe contaminate.

În total, s-au generat 1112 observații privind contaminarea și s-a detectat o contaminare în 95% (1054) din observații. Rata de detecție a crescut la 96% (939/976) atunci când procentajul de contaminare a fost între 10% și 90% (masă/masă). Dintre cele 37 de observații între 10% și 90% contaminare, în care contaminarea nu a fost detectată, 12 nu au îndeplinit specificația de acoperire pentru definirea variantelor mici de ADN. Acoperirea scăzută împiedică detectarea contaminării, dar pentru variantele mici de ADN nu s-a raportat atenuarea oricărui efect de contaminare. Cincisprezece observații nu au îndeplinit specificația de amplificare a genelor (valoarea CC a numărului mediu din interval) pentru definirea amplificării genelor. Pentru aceste specimene nu se va raporta niciun rezultat al amplificării genelor.

Studiul a demonstrat faptul că se preconizează că testul TSO Comprehensive (UE) va avea o incidență scăzută a contaminării încrucișate între godeuri sau între cicluri. Aceste rezultate, împreună cu indicatorii de contaminare din software scad riscul de rezultate de variante false din cauza contaminării specimenelor.

Evaluarea kitului de extracție a acidului nucleic

S-au evaluat cu TSO Comprehensive (UE) trei kituri de extracție ADN și ARN disponibile pe piață. Cele trei kituri de extracție au izolat ADN și ARN din aceleași secțiuni de țesut FFPE. Diferențele între kituri s-au rezumat la agentul de deparafinare și pașii de legare a acidului nucleic ([Tabelul 43](#)). Kitul 1 a fost kitul de extracție predominant pentru evaluarea performanței TSO Comprehensive (UE).

Tabelul 43 Caracteristicile kitului

Set	Agent de deparafinare	Legarea acidului nucleic
1	Propriu	Coloană
2	Xilen	Coloană
3	Ulei mineral	Bile magnetice

Efectele kiturilor de extracție asupra validității bibliotecilor și a definirii de variante sunt rezumate în [Tabelul 44](#) și [Tabelul 45](#). S-a raportat diferența dacă valorile medii aferente kitului de extracție au fost diferite semnificativ. Diferențele valorilor medii dintre kiturile de extracție au fost calculate raportat la kitul 1 cu rol de control, deoarece kitul 1 a fost utilizat pentru a extrage majoritatea acizilor nucleici utilizați pentru studiile analitice TSO Comprehensive (UE). Diferența valorilor medii față de kitul 1 a fost raportată pentru a ilustra modul în care diferite kituri de extracție ar afecta celelalte studii analitice TSO Comprehensive (UE).

Tabelul 44 Efectele kiturilor de extracție asupra validității bibliotecilor

Tip de variantă	Metrici CC bibliotecă	Diferență valoare medie față de kitul 1
Variante ADN scurte/TMB	Acoperire medie a exonilor (număr)	Kitul 2 mai mare cu 56 de citiri
	PCT Exon 50X (%)	Kitul 3 mai mic cu 0,298%
	Dimensiune medie a inserțiilor (bp)	Kitul 2 și kitul 3 mai mici cu 3 bp
MSI ADN	Locații MSI utilizabile	Kitul 3 mai mare cu 8 locații

Tip de variantă	Metrici CC bibliotecă	Diferență valoare medie față de kitul 1
Amplificări de gene ADN	Acoperire MAD (număr)	Kitul 2 mai mic cu 0,0043
	Numărul mediu din interval	Kitul 2 mai mic cu 0,5825, kitul 3 mai mare cu 0,3086
ARN (variante cu fuziune/splice)	Dimensiune medie a inserțiilor (bp)	Kitul 3 mai mic cu 2 bp
	Jurnal (CV mediu de acoperire a genelor 500X)	Kitul 2 mai mare cu 0,029
	Total pe citiri țintă	Nicio diferență semnificativă

S-a observat că kiturile de extracție 2 și 3 au valori de susținere crescute, astfel încât fuziunile și variantele splice din apropierea LoD au o probabilitate mai mare de detectare datorită selectării kitului de extracție.

Tabelul 45 Efectele kiturilor de extracție asupra definirii de variante

Tip variantă (unități)	Definire variantă (diferența medie față de kitul 1)
Variante ADN scurte (VAF)	Nesemnificativ din punct de vedere tehnic Variante țintite: variația dintre kituri a fost mică în raport cu cea reziduală Variante nețintite: Nu există diferențe semnificative pentru primele două compartimente VAF. Nu există diferențe semnificative în ceea ce privește semnificația statistică.
TMB (mutație per megabază)	Nesemnificativ din punct de vedere tehnic, variația dintre kituri a fost mică față de cea reziduală
MSI (% locații instabile)	Kitul 3 este mai mic cu 1,9% locații instabile
Amplificare de gene (modificare de diapazon)	Modificări de diapazon mai mari pentru kitul 2 (0,06) și kitul 3 (0,08)
Fuziuni (citiri de susținere)	Creștere a citirilor de susținere pentru kitul 2 cu 51% și pentru kitul 3 cu 23%
Variante splice (citiri de susținere)	Creștere a citirilor de susținere cu 48% pentru kiturile 2 și 3

Substanțe care interferează

A fost evaluat impactul substanțelor endogene și exogene potențiale asupra performanței testului TSO Comprehensive (UE). Substanțele endogene (melanina și hemoglobina) au fost adăugate treptat, în doze prestabilite, în specimene în timpul procesului de extracție a acidului nucleic. Substanțele exogene (etanol, xilen și proteinază K) au fost prezente în procesul de extracție a acidului nucleic, fiind adăugate și ele treptat, în doze prestabilite, în acidul nucleic, înainte de pregătirea bibliotecii. Atunci când s-a observat interferență cu proteinaza K dozată, au fost evaluate și concentrațiile crescute de proteinază K în timpul procesului de extracție. În timpul pregătirii bibliotecii au fost adăugate amorse index în exces (15% și 30%). Cu excepția primerilor index, s-au adăugat substanțe la specimenele FFPE din creier, sân, colon, plămân, tiroida medulară,

NSCLC, ovare, prostată, salivă, piele, țesut moale și țesut tiroidian - pentru analiza ADN au fost extrase 8 specimene și pentru analiza ARN au fost extrase 13 specimene. Pentru primerii de referință, au fost utilizate șase probe FFPE din trei tipuri diferite de țesut (tiroidă, vezică urinară, colon) pentru analiza ADN și cinci probe FFPE din patru tipuri diferite de țesut (plămân, tiroidă, colon, sân) pentru analiza ARN. A existat un control endogen nedozat și un control exogen tampon sau dozat cu apă pentru fiecare dintre cele 16 specimene unice. S-a evaluat efectul necrozelor pe un set diferit de opt specimene FFPE de țesut cerebral, colonic și pulmonar. S-a utilizat un control cu macrodisecție fără necroză pentru fiecare specimen cu necroză. Pentru toate substanțele care interferează s-au testat patru duplicate/substanță cu TSO Comprehensive (UE) și au fost comparate cu starea controalelor corespunzătoare pentru detecția de variante ADN scurte, amplificări de gene, fuziuni ARN și variante ARN splice, precum și pentru status MSI și scor TMB. Au fost incluse atât variantele CDx, cât și variantele de profilare tumorală.

Detecția variantelor ADN

Melanina (0,2 µg/ml), hemoglobina (2 mg/ml), etanolul (5%), proteinaza K (0,04 mg/ml în acid nucleic) și xilenul (0,0001%) nu interferează cu scorul TMB, statusul MSI, variantele ADN scurte și amplificările de gene.

Detecția variantelor ARN

Datele nu susțin interferența melaninei (0,2 µg/ml), etanolului (5%) și xilenului (0,0001%) asupra fuziunilor ARN sau a variantelor splice. Hemoglobina (2 mg/ml) a interferat (citiri de susținere reduse) cu trei variante diferite cu splice la nivelul genei MET. Nu au fost afectate o variantă splice la nivelul genei AR (trei specimene diferite) și una la nivelul genei EGFR (un specimen). Dacă laboratorul rulează ARN cu testul, țesutul cu hemoglobină trebuie evitat sau minimizat atunci când se obțin secțiuni din blocul de țesut.

Proteinaza K (0,04 mg/ml în acid nucleic) a interferat cu fuziunile ARN și variantele splice. Proteinaza K a fost testată la 2,6 mg/ml și 5,2 mg/ml în timpul procesului de extracție, care este de 2x și 4x concentrația standard dintr-un kit disponibilă în comerț. Fuziunile au fost inhibitate la 4x, dar nu și la 2x proteinază K. Variantele splice au fost inhibitate la 2x proteinază K. Proteinaza K sau o enzimă echivalentă nu trebuie crescută în timpul extracției din concentrația standard furnizată într-un kit de extracție.

Varianta de îmbinare care susține citirile scade cu 30% primeri indexați în exces, dar nu cu 15% exces.

Necroza

Prezența de țesut necrotic în proporție de până la 70% nu a interferat cu scorul TMB, statusul MSI sau variantele ADN scurte. Variantele ARN (citiri de susținere) și detectarea amplificării genetice (modificări pliere) s-au redus în speciimenele cu un conținut necrotic $\geq 25\%$ și $\geq 23\%$ (după zonă) în zona tisulară. Dacă secțiunile de specimen prezintă necroză în proporție de peste $\geq 23\%$ din totalul zonei tisulare, se impune macrodisecția țesutului necrotic.

Stabilitate

Stabilitate în timp real

Stabilitatea în timp real s-a utilizat pentru determinarea termenului de valabilitate al kitului de testare TSO Comprehensive (UE) în condiții de depozitare conform cu specificațiile de pe etichetă. Designul studiului s-a bazat pe testarea a 3 loturi de reactivi, utilizând designul clasic pentru studii de stabilitate descris în CLSI EP25-A. Kiturile au fost depozitate în configurația finală completă pe întreaga durată a studiului, în condițiile de depozitare specificate pe eticheta produsului. Componentele kiturilor congelate au fost depozitate la temperaturi între -15 °C și -25 °C. Componentele kiturilor refrigerate au fost depozitate la temperaturi între 2 °C și 8 °C.

S-au testat aspectul și criteriile de lansare funcționale la intervale de timp specificate. De asemenea, s-au analizat, pentru materialele de control al calității, tendințele valorilor pentru definirea de variante și QC pentru specimene. A fost determinat termenul de valabilitate pentru fiecare reactiv. Datele de expirare sunt atribuite pe baza datei de fabricație și a termenului de valabilitate. Data de expirare a kiturilor se bazează pe reactivul cu termenul de expirare cel mai scurt.

Stabilitatea kitului la utilizare

Stabilitatea la utilizare a kitului de testare TSO Comprehensive (UE) a fost evaluată în condiții standard de utilizare, pe durata valabilității, în sprijinul utilizărilor multiple ale kiturilor. Kitul de reactivi a fost supus la multiple cicluri de congelare/decongelare și a fost testat în sprijinul a maximum 4 utilizări. În plus, s-au pregătit 8 biblioteci ADN și 8 biblioteci ARN de 3 ori în total, pentru testarea numărului maxim de biblioteci suportat (24 biblioteci ADN/kit și 24 biblioteci ARN/kit). Toate criteriile funcționale de lansare pentru kit au fost respectate în toate ciclurile de congelare/decongelare și pentru toate intervalele de timp testate. Testarea specimenelor FFPE cu reactivi cu vechime ≥ 25 luni s-a efectuat pentru evaluarea impactului testării la utilizare asupra definirii de variante. Analiza calitativă a variantelor țintite demonstrează că evenimentele din timpul utilizării nu au afectat definirea de variante.

Stabilitatea acidului nucleic

Stabilitatea acizilor nucleici (ADN și ARN) și cuantificarea asociată acestora pentru utilizarea cu testul TSO Comprehensive (UE) au fost evaluate utilizând specimene FFPE din mai multe tipuri de țesut. Blocurile FFPE au fost secționare și toți acizii nucleici au fost extrași simultan. Acidul nucleic extras a fost amestecat temeinic, cuantificat, verificat din punctul de vedere al calității acidului nucleic și împărțit în două seturi de tuburi de unică folosință care urmează să fie congelate la două intervale de timp: Controlul T0 (referință) și testul T1 (≥ 28 de zile). Toate speciemenle ARN extrase au fost depozitate între -85 °C și -65 °C și toate speciemenle ADN extrase au fost depozitate între -25 °C și -15 °C pe duratele de timp indicate și apoi procesate prin testul TSO Comprehensive (UE) în mai multe replicare și de mai mulți operatori. Starea testului T1 a fost comparată cu controlul pentru statusul MSI, scorul TMB, amplificările genelor, variantele mici de ADN, fuziunile ARN și

variantele splice ARN. Datele indică faptul că acizii nucleici și cuantificarea lor asociată pentru utilizare cu testul TSO Comprehensive (UE) sunt stabili timp de până la 28 de zile atunci când sunt depozitați la temperaturile recomandate (ARN între -85 °C și -65 °C și ADN între -25 °C și -15 °C).

Stabilitatea bibliotecilor

Stabilitatea bibliotecilor utilizând fiecare dintre cele șase puncte de oprire sigure pentru analiză (consultați [Tabelul 5](#)) a fost evaluată utilizând probe FFPE din mai multe tipuri de țesut. Bibliotecile de control (T0, fără puncte de oprire) au fost secvențiate imediat la sfârșitul fluxului de lucru. Părți alicote din aceleași biblioteci au fost ținute în punctele de oprire la -25 °C până la -15 °C pe perioada (T1) pentru a susține zilele enumerate în [Tabelul 5](#). T1 a fost comparat cu T0 pentru variante mici de ADN, TMB, amplificări ale genelor, MSI, fuziuni ARN și variante de matisare ARN cu variante CDx și de profilare tumorală. Datele indică faptul că bibliotecile generate de TSO Comprehensive (UE) analiză sunt stabile în conformitate cu Instrucțiunile de utilizare.

Stabilitatea țesuturilor FFPE fixate pe lamele

Stabilitatea țesuturilor FFPE fixate pe lamele pentru utilizare cu testul TSO Comprehensive (UE) a fost evaluată prin secționarea blocurilor FFPE (secțiuni de 5 μm) din diverse specimene unice, fixate pe lamele, urmată de depozitarea la temperatura ambiantă (22 °C) la 2 intervale de timp. ARN-ul a fost extras și depozitat între -65 °C și -85 °C și ADN-ul a fost extras și depozitat între -15 °C și -25 °C timp de mai puțin de 1 săptămână înainte de testare. Materialul acidului nucleic a fost cuantificat și apoi procesat cu testul TSO Comprehensive (UE) în decurs de 24 de ore pentru fiecare interval de timp. La fiecare interval de timp au fost testate mai multe replicare de mai mulți operatori per specimen cu testul TSO Comprehensive (UE) și comparate cu momentul T0 pentru MSI, TMB, amplificări ale genelor, variante ADN mici, fuziuni ARN și variante splice ARN, inclusiv variante CDx și de profilare tumorală. Definirea variantelor a fost evaluată și a îndeplinit toate criteriile de acceptare, indicând faptul că țesuturile FFPE fixate pe lamele pentru utilizare cu testul TSO Comprehensive (UE) sunt stabile la temperatura ambiantă timp de până la 4 săptămâni (28 de zile). Se observă că s-a detectat o scădere cu 10% a ratei de validitate a CC a bibliotecii MSI după 4 săptămâni (28 de zile) din cauza unei combinații între operator și durata de depozitare. Fuziunile ARN și variantele de îmbinare au avut o scădere de aproximativ 29% a citirilor de susținere după depozitarea pe lame timp de 4 săptămâni (28 de zile).

Marja de eroare aplicată la titrarea aportului de acid nucleic

Aportul de acid nucleic pentru testul TSO Comprehensive (UE) a fost evaluat prin testarea ADN din 33 de specimene FFPE cu 17 tipuri de țesuturi, la niveluri de aport între 10 ng și 500 ng, și prin testarea ARN din 5 specimene FFPE cu 5 tipuri de țesuturi, la niveluri de aport între 10 ng și 85 ng. Au fost evaluate valorile bibliotecii QC, fiind dependente de specimen. Rezultatele pentru ADN au demonstrat că o parte, dar nu toate, din valorile QC pentru specimenele ADN au răspuns la aport crescut peste cel nominal, de 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE nu a răspuns la aporturi peste 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE a indicat o corelație pozitivă cu creșterea aportului.
- PCT_EXON_50X a crescut proporțional cu creșterea aportului până la 80 ng.

- `USABLE_MSI_SITES` a crescut proporțional cu creșterea aportului. Unele specimene cu sub 40 `USABLE_MSI_SITES` la 40 ng au corespuns specificațiilor la aporturi mai mari, permițând, astfel, calcularea unui scor MSI.
- `MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET` a crescut proporțional cu creșterea aportului.
- Creșterea aportului a dus la creșterea `COVERAGE_MAD` aproape de limita maximă specificată.

Valorile QC pentru specimenele ARN au crescut (`MEDIAN_INSERT_SIZE` și `TOTAL_ON_TARGET_READS`) sau scăzut (`MEDIAN_CV_GENE_500X`) de la 10 ng la 40 ng, dar, de regulă, nu s-au modificat între 40 ng și 85 ng.

Limita de blank

Procentajul de rezultate fals pozitive (din totalul de rezultate negative scontat) a fost evaluat prin testarea în duplicat de țesut FFPE adiacent normal sau benign, teoretic fără variante somatice pentru variante ADN scurte, amplificare de gene, MSI, fuziuni ARN și variante ARN splice. Nu s-au analizat rezultatele fals pozitive pentru TMB, deoarece nu există valoare limită clinică. S-au analizat în duplicat șase specimene FFPE ADN și 6 ARN, cu 2 operatori, în 3 zile, pentru fiecare din cele 2 loturi de reactivi. A fost regrupat și resecvențiat un subset de specimene în formate 3x ADN și 3x ARN pentru evaluarea rezultatelor fals pozitive în câteva configurații multiplex suportate de acest dispozitiv. În plus, s-au analizat în duplicat 30 de specimene ARN suplimentare procesate cu 1 lot de reactivi, împărțite între 2 operatori. În total, s-au evidențiat 168 de observații posibile pentru ADN și 228 pentru ARN, reduse cu bibliotecile nevalide pentru fiecare tip de variantă. Procentajul de rezultate fals pozitive s-a calculat la nivel de genă pentru amplificări și la nivel de poziție (aproximativ 1,9 milioane de poziții) pentru variante ADN scurte. Procentul de rezultate fals pozitive pentru tipurile de variante de ADN este prezentat în [Tabelul 46](#). TSO Comprehensive (UE) nu are nicio afirmație CDx (Nivelul 1) pentru variantele mici de ADN, astfel încât nu pot fi raportate variante mici de ADN fals pozitive pentru Nivelul 1. Cele 271 de rezultate fals pozitive au fost nivelate de Baza de cunoștințe TSO Comprehensive (UE). Niciun rezultat fals pozitiv nu a fost semnificativ clinic (Nivelul 2). Au existat 4 rezultate fals pozitive la nivelul 3, rezultate din 2 variante din 4 (2,4%) observații din cele 168 de observații. Procentajul de rezultate fals pozitive pentru variantele ARN cu fuziuni și splice a fost de 0%, așa cum se arată în [Tabelul 47](#).

Tabelul 46 Rezultate fals pozitive pe tipuri de variante ADN

Tip de variantă	Rezultate fals pozitive
Amplificări de gene	0% (0/9912)
Variante ADN scurte	0,0001% (271/295.801.567)
MSI	0% (0/156)
TMB	Nu se aplică*

* Nu sunt aplicabile rezultatele fals pozitive, deoarece TMB se raportează sub formă de scor și nu prezintă rezultate calitative.

Tabelul 47 Rezultate fals negative pe tipuri de variante ARN

Tip de variantă	Rezultate fals pozitive
Fuziune	0% (0/227)
Variantă splice	0% (0/227)

Limita de detecție

S-au efectuat două studii de evaluare a limitelor de detecție pentru TSO Comprehensive (UE). În studiul 1 s-au evaluat variante ADN RET scurte, fuziuni RET și fuziuni NTRK1-3. În studiul 2 s-au evaluat alte variante de analiză a profilului tumoral.

Studiul 1

S-au determinat limitele de detecție (LoD) pentru variante ADN scurte NTRK1, NTRK3 și RET și fuziunile NTRK1-3 și RET. LoD este valoarea cea mai mică a analitului (de exemplu, frecvența alelelor variantei sau citirile de susținere) care poate fi detectată consecvent (limită de detecție 95% sau eroare 5% de tip II). În cadrul studiului s-au utilizat țesuturi FFPE cu variante ADN RET scurte (cancer tiroidian medular), fuziuni RET (carcinom tiroidian papilar, tumoare Spitz atipică) și fuziuni NTRK1-3 (gliom cu evoluție lentă, glioblastom multiform, sarcom miofibroblastic, sarcom, carcinom mamar secretor, cancer de colon), precum și o linie de celule tratată cu FFPE cu variante ADN NTRK1 și NTRK3 scurte. Fiecare specimen a fost diluat la cel puțin 5 niveluri de testare (între aprox. 0,01 și 0,10 VAF pentru variantele ADN scurte și 2-25 citiri de susținere pentru fuziuni). S-au efectuat 18 observații/lot la fiecare nivel de testare, generate de 3 operatori, pe 3 instrumente de secvențiere cu inițiere a pregătirii bibliotecii, în 3 zile neconsecutive, cu 2 replici ale fiecărui nivel de testare pentru specimen. S-au testat două loturi de reactivi.

Pentru variantele ADN, s-au analizat independent 2 loturi cu model de regresie probit sau pe baza ratei de succes (nivelul testat cel mai redus (estimare punctuală) $\geq 95\%$), pentru determinarea LoD pentru fiecare variantă, pe loturi. LoD cea mai mare din cele două loturi de reactivi a fost considerată limita de detecție pentru respectiva variantă ([Tabelul 48](#)).

Pentru fuziunile ARN, s-au utilizat linii de celule FFPE pentru estimarea valorilor LoD pentru fiecare genă cu fuziune. LoD au fost apoi verificate cu țesuturi FFPE, cu biblioteci pregătite în duplicat, cu 3 operatori, pe 3 instrumente și cu 3 loturi de reactivi, generându-se 54 de observații/variantă aproape de LoD stabilită pe baza liniilor de celule FFPE. Limitele de detecție declarate pentru fiecare fuziune ([Tabelul 49](#)) sunt media cea mai redusă a citirilor de susținere care au obținut rata de succes (estimare punctuală) $\geq 95\%$.

Tabelul 48 Limita de detecție pentru variante ADN scurte NTRK1, NTRK3 și RET

Marker	Chr ¹	Poziție	Referință	Alternativă	Limita de detecție (Frecvența alelelor variantei)
NTRK1 G595R (SNV) ²	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV) ²	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV) ²	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV) ²	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (deleție)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = cromozom

² Aceste variante ADN au fost analizate prin regresie probit; celelalte variante ADN au fost analizate pe baza ratei de succes.

Tabelul 49 Limita de detecție pentru fuziunile NTRK și RET

Genă	Fuziune	Limita de detecție (citiri de susținere)
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

Studiul 2

Au fost evaluate limitele de detecție (LoD) pentru variantele de analiză a profilului tumoral raportate de TSO Comprehensive (UE). LoD este valoarea cea mai mică a analitului (de ex. frecvența alelelor variantei, modificarea de diapazon sau citirile de susținere) care poate fi detectată consecvent (rată de succes 95% sau eroare 5% de tip II). S-au diluat la multiple niveluri de testare specimene FFPE din 17 tipuri de țesuturi cu variante. S-au generat șase observații/nivel, cu doi operatori care au utilizat loturi de reactivi și instrumente diferite.

Variante ADN

Au fost determinate și rezumate sub formă de intervale LoD pentru 10 clase de variante ADN scurte (25 de variante în total) și 2 amplificări de gene ADN (ERBB2 și MET) ([Tabelul 50](#)). Sunt incluse și variante RET din studiul LoD 1. Două din 3 inserții mai mari de 5 bp au prezentat LoD de 0,034 și 0,036 VAF, iar o a treia, LoD de 0,215 VAF. Aceasta din urmă era o inserție într-o zonă cu complexitate redusă, în care inserția adaugă repetări suplimentare, afectează alinierea și necesită mai multe citiri pentru consecvență în detecție. Prin urmare, unele contexte genomice de complexitate redusă pot afecta detectarea inserțiilor > 5 bp.

Tabelul 50 Limita de detecție pentru variante ADN scurte și amplificări de gene

Tip (unitate de măsură pentru LoD)	Clasă de variante/ Context genomic	Număr de variante	Interval (VAF)
Variante ADN scurte (frecvența alelelor variantei)	SNV-uri	5	0,016-0,064
	MNV	3	0,022-0,048
	Inserție (1-2 bp) lângă repetările homopolimerice	2	0,086-0,104
	Inserție (1-2 bp) lângă repetările dinucleotidice	2	0,038-0,051
	Inserție (3-5 bp)	2	0,030-0,056
	Inserție (> 5 bp și până la 25 bp)	3	0,034-0,215
	Deleție (1-2 bp) lângă repetările homopolimerice	2	0,094-0,100
	Deleție (1-2 bp) lângă repetările dinucleotidice	2	0,033-0,070
	Deleție (3-5 bp)	2	0,028-0,064
	Deleție (> 5 până la 25 bp)	2	0,047-0,055
Amplificări de gene (modificare de diapazon)	Pe gene (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analiza variantelor neștintite a fost efectuată pe baza probelor din Studiul 1 care au avut cel puțin cinci niveluri de testare. Fiecare variantă neștintită a fost analizată individual și o LoD estimată doar pentru variantele cu cel puțin un nivel > 0% și ≤95% rată de succes și cel puțin un nivel ≥95% rată de succes. [Tabelul 51](#) prezintă percentilele împreună cu valorile LoD minime și maxime observate în funcție de clasă pentru variantele neștintite. Variantele neștintite oferă mai multe variante în funcție de clasă decât au fost testate în Studiul 2 și sunt în concordanță cu intervalele LoD din [Tabelul 50](#).

Tabelul 51 Rezumat statistici pentru limitele de detecție în funcție de clasa de variante neîntite (din Studiul 1)

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

Fuziuni

S-au determinat LoD pentru 19 fuziuni din 20 gene din grupul TSO Comprehensive (UE), generându-se de la 9 la 31,3 citiri de susținere (Tabelul 52). Încă 3 gene (NTRK1-3) au fost testate într-un alt studiu. Gena RET a fost testată în acest studiu și încă un studiu. Șaisprezece fuziuni cu LoD determinate au prezentat date consecvente cu LoD comună pentru 16 citiri de susținere, utilizând un interval de încredere bilateral superior (UCL) 95%. Două fuziuni au prezentat LoD de 24,7 și 31,3 citiri de susținere, inconsecvente cu LoD comună.

Fuziunea FGFR2-SRPK2 cu valoare LoD de 24,7 citiri de susținere prezenta zone suprapuse repetate la punctul de întrerupere, conform adnotărilor din software-ul de analiză TSO Comprehensive (UE). Zonele repetate la un punct de întrerupere prezintă, de regulă, dovezi mai slabe, deoarece citirile se pot mapa oriunde în genom sau pot rămâne nealiniat. De asemenea, zonele repetate complică procesul de asamblare (utilizat pentru identificarea secvențelor cu fuziuni) și necesită dovezi suplimentare pentru construirea secvenței corecte. SEPT14-EGFR este un alt exemplu de fuziune cu secvență omoloagă la punctul de întrerupere.

Fuziunea BCL2-IGHJ5 cu valoare a LoD de 31,3 citiri de susținere include o genă foarte scurtă (IGHJ5), cu punct de întrerupere în imediata proximitate a începutului unui exon, necesitând alinieri scurte, decalate. De aceea, au fost necesare mai multe citiri pentru consecvență în detecție.

Tabelul 52 Limita de detecție pentru fuziuni

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

Fuziune	Punct întrerupere gena A	Punct întrerupere gena B	LoD	LoD comună
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	da
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	da
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nu
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	da
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	da
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	da
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	da
DHX8 ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	da
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	da
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	nu
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	da

Variante splice

LoD detectate la cele 2 variante ARN splice, MET și EGFR, au fost în număr de 18,7, iar numărul de citiri de susținere, 16,7.

Conținut tumoral

Rezultatele studiului furnizează informații pentru recomandările privind conținutul tumoral pentru specimene clinice. De regulă, cu cât conținutul tumoral este mai concentrat, cu atât este mai puternic semnalul (VAF, modificare de diapazon sau citiri de susținere) pentru variantele din tumoare. Recomandările privind conținutul tumoral minim se bazează pe observațiile de mai jos. Valori LoD pentru variante ADN scurte mai mici de 0,104 VAF (cu excepția inserției TP53). Pentru detectarea de mutații conducătoare în tumoare (frecvența alelelor variantei 0,50), se recomandă conținut tumoral 20%, astfel încât aceste mutații să prezinte VAF 0,10, valoare mai mică sau egală cu LoD. La conținut tumoral 20%, genele amplificate cu modificare de diapazon 5,5 (11 copii) sunt detectate consecvent pe baza unei limite de detecție cu modificare de diapazon 1,8. La conținut tumoral 20%, fuziunile cu 74 citiri de susținere sunt detectate consecvent pe baza unei limite de detecție cu 14,7 citiri de susținere.

Reproductibilitate

S-au efectuat două studii de evaluare a reproductibilității pentru testul TSO Comprehensive (UE). În studiul 1 s-au evaluat variante ADN RET scurte și variante cu fuziuni NTRK și RET. În studiul 2 s-au evaluat alte variante de analiză a profilului tumoral.

Studiul 1

Acest studiu s-a efectuat pentru evaluarea reproductibilității testului TSO Comprehensive (UE) în 3 centre de testare (1 intern, 2 externe), cu 2 operatori/centru, cu 2 replici intraciclu și în 3 zile de testare neconsecutive. Testarea s-a efectuat pe un grup de reproductibilitate incluzând specimene ADN cu variante ADN RET scurte cunoscute și specimene de ARN cu variante cu fuziuni NTRK1-3 și RET cunoscute specifice, cu specimene de țesuturi și linii de celule fixate cu formalină și încorporate în parafină (FFPE). Grupul conținea componente ARN și ADN cu nivel de variantă jos și ridicat, același număr de componente ale grupului fiind de nivel scăzut și ridicat pentru fiecare clasă de variante. Componentele grupurilor de nivel ridicat au fost țintite la aproximativ de 2 sau 3 ori LoD, iar cele de nivel jos, aproximativ la valoarea LoD. În fiecare centru, fiecare operator a testat componentele grupurilor în duplicat de 3 ori, generând 6 observații/țintă/componentă grup. De la toate cele 3 centre, s-au generat 36 de observații/componentă grup (3 centre/instrumente x 2 operatori x 2 replici intraciclu x 3 zile de inițiere).

PPC și PNC pentru variantele ADN scurte țintite și variantele ARN cu fuziuni țintite la nivel ridicat au fost determinate ca fiind criterii finale primare. PPC și PNC pentru variantele ADN scurte țintite și variantele ARN cu fuziuni țintite la nivel scăzut au fost calculate ca fiind criterii finale secundare. Intervalele de încredere bilaterale 95% (ÎI) asociate criteriilor finale au fost calculate cu metoda scorului Wilson. Analizele primare s-au efectuat pentru estimarea PPC și PNC (cu ÎI 95% asociate) în componentele grupurilor cu nivel ridicat prin combinarea observațiilor obținute cu testul TSO Comprehensive (UE) pentru o anumită țintă dintr-un grup de componente reprezentând clasa de variante aplicabilă (de exemplu, variante ADN scurte și fuziuni ARN) pentru toate centrele/instrumentele, operatorii și ciclurile. Pentru fiecare variantă țintită, observațiile obținute cu testul TSO Comprehensive (UE) pentru alte componente ale grupurilor de nivel ridicat țintite pentru același tip de variantă dar fără varianta determinată de regula aplicabilă majorității au fost combinate pentru calcularea PNC. PPC și PNC globale pentru componentele grupurilor de nivel jos țintite au fost determinate de manieră similară.

Variante ADN RET scurte

Pentru variantele de ADN scurte de nivel ridicat, PPC global a fost 100,0% (207/207, ÎI 95%: 98,2-100,0%) ([Tabelul 53](#)). Pentru variantele de ADN scurte de nivel ridicat, PNC global a fost 100,0% (1035/1035; ÎI 95%: 99,6%-100,0%) ([Tabelul 54](#)). Pentru variantele de ADN scurte de nivel jos, PPC global a fost 99,1% (210/212, ÎI 95%: 96,6-99,7%), iar PNC global, 100,0% (1026/1026; ÎI 95%: (99,6-100,0%).

Tabelul 53 PPC pentru testul TSO Comprehensive (UE) de detecție a variantelor ADN scurte din grupuri țintite de nivel ridicat și jos

Nivel de variantă	Tip de variantă	Variantă țintită (nucleotidă)	Variantă țintită (aminoacid)	N	VAF medie ¹	PPC (%) (n/N)	Î ² 95%
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Deleție	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Tot ADN-ul mic variante ridicate	Tot ADN-ul mic variante ridicate	Tot ADN-ul mic variante ridicate	207	N/A ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Deleție	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Tot ADN-ul mic variante reduse	Tot ADN-ul mic variante reduse	Tot ADN-ul mic variante reduse	212	N/A ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Abrevieri: N/A: nu se aplică; VAF: frecvența alelelor variante.

² 95% interval de încredere bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

Tabelul 54 PNC pentru testul TSO Comprehensive (UE) de detecție a variantelor ADN scurte din grupuri țintite de nivel ridicat și jos

Nivel de variantă	Tip de variantă	Variantă țintită (nucleotidă)	Variantă țintită (aminoacid)	N ¹	PNC (%) (n/N)	Î ² 95%
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Deleție	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Tot ADN-ul mic variante ridicate	Tot ADN-ul mic variante ridicate	Tot ADN-ul mic variante ridicate	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Deleție	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Tot ADN-ul mic variante reduse	Tot ADN-ul mic variante reduse	Tot ADN-ul mic variante reduse	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Toate observațiile grupate din combinațiile de variante din grup cu detecții majoritar negative (variantele țintite cu fuziuni cu mai puțin de 50% detecții pozitive).

² 95% interval de încredere bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

Tabelul 55 prezintă analiza componentelor divergenței totale pentru frecvența alelelor variantei (VAF) din aproximativ 36 de observații pentru fiecare parte a grupului. Abaterea standard (SD) și coeficientul de variație procentual (%CV, total și pentru fiecare sursă) au fost calculate și prezentate pentru fiecare variantă DNA RET scurtă.

Tabelul 55 Analiza componentelor divergenței VAF în variante ADN scurte din grupuri cu TSO Comprehensive (UE)

Nivel de variantă	Tip de variantă	Variantă țintită (nucleotidă)	Variantă țintită (Aminoacid)	N	VAF medie	SD locație (%CV)	SD operator (% CV)	SD zi (%CV)	SD duplicat (%CV)	SD total (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	(33)	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Deleție	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)
	Insertie	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,6)	0,010 (10,1)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (22,2)	0,009 (22,2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0)	0,003 (9,8)	0,002 (6,2)	0,007 (21,7)	0,008 (24,6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,008 (17,5)	0,008 (18,5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0)	0,008 (10,7)	0,000 (0,0)	0,011 (14,9)	0,013 (18,4)
	Deleție	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)
	Insertie	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)

Fuziuni NTRK 1-3 și RET

Pentru variantele de ARN fuzionate de nivel ridicat din grupuri, PPC global a fost 99,3% (285/287, ÎI 95%: 97,5%-99,8%) (Tabelul 56). PPC a fost 100% pentru fiecare variantă din grup, cu excepția BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; ÎI 95%: 81,9%-98,5%]). Pentru variantele de ARN fuzionate de nivel ridicat din grupuri, PNC global a fost 100,0% (1724/1724; ÎI 95%: 99,8%-100,0%) (Tabelul 57). Pentru variantele de ARN fuzionate de nivel jos din grupuri, PPC global a fost 95,4% (272/285, ÎI 95%: 92,3-97,3%), iar PNC global, 100,0% (1851/1851; ÎI 95%: (99,8%-100,0%)).

Tabelul 56 PPC TSO Comprehensive (UE) pentru testul de detecție a fuziunilor NTRK și RET din grupuri țintite de nivel ridicat și jos

Nivel de variantă	Fuziune țintită	N	Media citirilor de susținere	PPC (%) (n/N)	ÎI 95%*
~2-3 x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0% (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Toate fuziunile, niv. ridicat	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 (29/36)	(65,0, 90,2)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 (33/34)	(85,1, 99,5)
	Toate fuziunile, niv. jos	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* 95% interval de încredere bilateral (ÎI) calculat cu metoda scorului Wilson.

Tabelul 57 PNC pentru TSO Comprehensive (UE) testul de detecție a fuziunilor NTRK și RET din grupuri nețintite de nivel ridicat și jos

Nivel de variantă	Fuziune țintită	N ¹	PNC (%) (n/N)	Î ² 95%
~2-3 x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Toate fuziunile, niv. ridicat	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Toate fuziunile, niv. jos	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Toate observațiile grupate din combinațiile de variante din grup cu detecții majoritar negative (variantele țintite cu fuziuni cu mai puțin de 50% detecții pozitive).

² 95% interval de încredere bilateral (Î) calculat cu metoda scorului Wilson.

Tabelul 58 prezintă analiza componentelor divergenței pentru citirile de susținere din aproximativ 36 de observații pentru fiecare fuziune țintită. SD și %CV (total și pentru fiecare sursă) s-au calculat și prezentat pentru fiecare fuziune țintită.

Tabelul 58 TSO Comprehensive (UE) Analiza componentelor divergenței citirilor de susținere pentru fuziune ARN țintită din grupuri cu

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

Studiul 2

S-a efectuat un al doilea studiu de evaluare a reproductibilității testului TSO Comprehensive (UE) în 3 centre de testare (2 externe și 1 intern), cu 2 operatori/instrumente per centru, 3 loturi de reactivi unice, în 4 zile de testare (neconsecutive) și cu 2 cicluri de secvențiere/bibliotecă de specimene.

Testul s-a efectuat cu specimene ADN și ARN din 41 de specimene de țesuturi FFPE și o linie de celule FFPE (1 specimen de țesut FFPE și o linie de celule FFPE fiind utilizate pentru a crea 2 componente de grup).

Specimenele de țesuturi au fost de următoarele tipuri: de vezică, osos, cerebral, mamar, de colon, de jejun, renal, hepatic, pulmonar, ovarian, de prostată, dermic, de țesut moale, stomacal, tiroidian și uterin. În total s-au testat 44 de componente de grupuri, inclusiv componentele cu variante ADN scurte (SNV, MNV, inserții și deleții), amplificări de gene, scoruri TMB diferite, scoruri MSI ridicate și componente de grupuri ARN cu variante cu fuziuni și splice. Majoritatea componentelor grupurilor prezentau variante țintite cunoscute, la niveluri de aproximativ 2-3 ori mai mari decât limita de detecție specifică variantei (~2-3xLoD).

LoD este concentrația de analit la care rezultatele observate ale testului sunt pozitive (variantă detectată în raport cu valoarea limită pentru TSO Comprehensive (UE)) în $\geq 95\%$ din cazuri. Nivelurile medii de variante

observate au fost clasificate ca aproximativ $<2 \times \text{LoD}$ (niveluri de variante observate la $<1,5 \times \text{LoD}$), $\sim 2-3 \times \text{LoD}$ (niveluri de variante observate între $1,5 \times \text{LoD}$ și $3,4 \times \text{LoD}$) și aproximativ $>3 \times \text{LoD}$ (niveluri de variante observate la $>3,4 \times \text{LoD}$).

Procentajele de detecții pozitive (PPC) pentru variante ADN scurte, amplificări de gene, MSI-High și variante ARN au fost calculate prin combinarea tuturor observațiilor din toate ciclurile de secvențiere și de la toate centrele. Procentajele de detecții negative (PNC) au fost calculate similar pentru variante ADN scurte, amplificări de gene și variante ARN. Pentru calcularea PNC pentru fiecare variantă țintită cunoscută, s-au combinat observațiile din testul TSO Comprehensive (UE) aferente membrilor grupurilor din același tip de variantă, dar cu alte variante, nederivate din același specimen-sursă și nerespectând regula aplicabilă majorității pentru respectiva variantă ($<50\%$ din determinări au fost pozitive) de la toate centrele, toți operatorii/de pe toate instrumentele, în toate zilele, cu toate loturile de reactivi și în toate ciclurile de secvențiere. Intervalele de încredere bilaterale 95% (ÎI) au fost calculate cu metoda scorului Wilson.

Variante ADN scurte

Tabelul 59 prezintă PPC pentru variantele ADN scurte țintite. Valorile PPC sunt cuprinse între 91,3% pentru SNV BRAF și 100% pentru majoritatea variantelor ADN scurte.

Tabelul 59 PPC pentru testul TSO Comprehensive (UE) de detecție a variantelor ADN scurte din grupuri țintite combinate

Nivel de variantă observat ¹	Tip de variantă	VARIANTĂ țINTITĂ (nucleotidă)	VARIANTĂ țINTITĂ (aminoacid)	VAF medie ²	PPC (%) (n/N)	ÎI 95% ³
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	DELEȚIE	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	DELEȚIE	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	INSERTIE	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	INSERTIE	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
$< 2 \times \text{LoD}$	INSERTIE	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
$\sim 2-3 \times \text{LoD}$	DELEȚIE	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)

Nivel de variantă observat ¹	Tip de variantă	Variantă țintită (nucleotidă)	Variantă țintită (aminoacid)	VAF medie ²	PPC (%) (n/N)	ÎI 95% ³
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	DELEȚIE	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	DELEȚIE	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INSERTIE	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERTIE	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Nivel de variantă calculat pe baza frecvenței medii observate a alelelor variantei.

² Frecvență medie a alelelor variante calculată pe baza rezultatelor observate ale analizei.

* Interval de încredere 95% bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

PNC au fost 100% în totalul variantelor ADN scurte.

Tabelul 60 prezintă analiza componentelor divergenței pentru rezultatele VAF, pentru fiecare sursă de divergență și variația totală în cadrul grupului cu variante ADN scurte.

Tabelul 60 Analiza divergenței componentelor pentru VAF, pentru variante ADN scurte

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

Au existat două variante ADN scurte țintite în al căror caz numărul de observații a fost prea mic pentru adaptarea modelului componentelor divergenței. În aceste două cazuri, SD global a fost 0,027 pentru varianta chr1_27024001_C_CG și 0,001 pentru varianta chr17_7578470_C_CGGCGG.

Amplificări de gene

Tabelul 61 prezintă PPC pentru amplificările de gene țintite. PPCs were 100,0% for MET and 100,0% for ERBB2.

Tabelul 61 PPC pentru testul TSO Comprehensive (UE) de detecție a amplificărilor de gene din grupuri țintite combinate

Nivel de variantă observat ¹	Variantă țintită	Medie observată, modificare de diapazon ²	Procentaj detecție pozitivă (%)	ÎI 95% ³
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Nivel de variantă calculat pe baza mediei modificării de diapazon observate.

² Modificarea de diapazon calculată pe baza rezultatelor observate ale analizei.

* Interval de încredere 95% bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

PNC au fost 100% în toate amplificările de gene.

Tabelul 62 prezintă analiza componentelor divergenței pentru rezultatele modificărilor de diapazon, pentru fiecare sursă de divergență și variația totală în cadrul grupului cu amplificări de gene țintite.

Tabelul 62 Analiza componentelor divergenței pentru modificarea de diapazon, pentru amplificările de gene țintite

Variantă țintită	N	Medie, modificare de diapazon	SD locație (%CV)	SD operator (locație) (%CV)	SD zi (locație, operator) (%CV)	SD lot (%CV)	SD ciclu (%CV)	SD total (%CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabelul 63 prezintă PPC pentru componentele grupului MSI-High țintite. PPC au fost 100% pentru ambele componente ale grupului MSI-H.

Tabelul 63 PPC TSO Comprehensive (UE) pentru testul de detecție a statusului MSI-H al componentelor grupurilor țintite combinate

Componentă grup	Scor MSI mediu ¹	N	Procentaj detecție pozitivă (%)	Î ² 95%
TPSBD4	60,5	36	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
TPSBD6	55,7	32	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
Toate componentele		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Scor mediu MSI observat, calculat pe baza rezultatelor observate ale analizei.

² Interval de încredere 95% bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

Tabelul 64 prezintă analiza componentelor divergenței pentru rezultatele scorului MSI, pentru fiecare sursă de divergență și variația totală în cadrul grupului componente țintite pentru status MSI-High.

Tabelul 64 Analiza divergenței componentelor pentru scorul MSI pentru componentele grupului MSI-High țintite

Componentă grup	N	Scor MSI mediu	SD locație (%CV)	SD operator (locație) (%CV)	SD zi (locație, operator) (%CV)	SD lot (%CV)	SD ciclu (%CV)	SD total (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

Pentru evaluarea reproductibilității scorurilor TMB, s-a efectuat o analiză cantitativă a componentelor grupului TMB vizate, reprezentând un interval de scoruri TMB scontate. **Tabelul 65** prezintă analiza componentelor divergenței pentru rezultatele scorului TMB, pentru fiecare sursă de variație și variația totală pentru componentele grupului TMB. Scorul SD TMB mediu a fost 1,0 (%CV = 13) pentru una din componente (scor TMB mediu = 7,6) și 1,1 (%CV = 2) pentru cealaltă componentă (scor TMB mediu = 63,2).

Tabelul 65 Analiza divergenței componentelor scorului TMB pentru componentele grupului TMB țintite

Componentă grup*	N	Scor TMB mediu	SD locație (%CV)	SD operator (locație) (%CV)	SD zi (locație, operator) (%CV)	SD lot (%CV)	SD ciclu (%CV)	SD total (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

* A existat 1 componentă a grupului TMB în cazul căreia numărul de observații ($N = 2$) a fost prea mic pentru adaptarea modelului componentelor divergenței. Pentru această componentă a grupului, media SD a fost 1,7.

Variante ARN

Tabelul 66 prezintă PPC pentru variantele ARN. Valorile PPC sunt cuprinse între 91,7% pentru KIF5B-RET și 100% pentru majoritatea variantelor ARN.

Tabelul 66 PPC pentru testul TSO Comprehensive (UE) de detecție a variantelor ARN din grupuri țintite combinate.

Nivel de variantă observat ¹	Tip de variantă	Variantă țintită	Media citirilor de susținere ²	PPC (%) (n/N)	ÎI 95% ³
> (~3x LoD)	Fuziune	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuziune	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuziune	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuziune	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuziune	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuziune	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuziune	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	Fuziune	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuziune	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuziune	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuziune	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuziune	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuziune	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0% (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuziune	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	Fuziune	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
	Fuziune	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
> 3x LoD	Fuziune	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Variantă splice	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	Variantă splice	MET exon 14 skipping	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Nivel de variantă calculat pe baza mediei citirilor de susținere observate.

² Medie a citirilor de susținere calculată pe baza rezultatelor observate ale analizei.

* Interval de încredere 95% bilateral calculat cu metoda scorului Wilson.

PNC a fost 100% pentru fiecare variantă ARN țintită, cu excepția fuziunii FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60% (984/988); Î 95%: (98,96-99,84%).

Tabelul 67 prezintă analiza componentelor divergenței pentru rezultatele citirilor de susținere, pentru fiecare sursă de divergență și variația totală în cadrul grupului cu variante ARN.

Tabelul 67 Analiza divergenței componentelor pentru citirile de susținere, pentru variante ARN

Variantă țintită	N	Media citirilor de susținere	SD locație (%CV)	SD operator (locație) (%CV)	SD zi (locație, operator) (%CV)	SD lot (%CV)	SD ciclu (%CV)	SD total (%CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8 ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPPSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR vIII variantă splice	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET salt exonul 14 variantă splice	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Precizie intralaborator

S-au efectuat două studii de evaluare a preciziei intralaborator pentru TSO Comprehensive (UE). Studiul 1 a evaluat fuziunile NTRK și RET și variantele ADN RET scurte. Studiul 2 a evaluat TMB și MSI.

Studiul 1

Precizia intralaborator a fost evaluată pentru fuziuni NTRK1-3 (gliom cu evoluție lentă, glioblastom multiform, sarcom miofibroblastic, sarcom, carcinom mamar secretor), fuziuni RET (cancer tiroidian și țesut dermic cu cancer necunoscut) și variante ADN RET scurte (cancer tiroidian medular) pe țesuturi FFPE corespunzătoare cancerelor indicate. Fiecare specimen a fost testat la două niveluri de variante: ~1x LoD (nivel de variantă jos) și ~2-3x LoD (nivel de variantă ridicat), cu excepția specimenului cu CCDC6-RET, care a fost testat doar la nivel de variantă jos. Fiecare din speciemenele de la fiecare nivel testat a fost testat în duplicat în fiecare pregătire de

biblioteca, de trei (3) operatori. Fiecare operator a inițiat pregătirea bibliotecii în trei (3) zile neconsecutive și a secvențiat pe trei (3) instrumente NextSeq 550Dx desemnate. S-au testat trei (3) loturi de reactivi, generându-se 54 observații/nivel. Unele niveluri au înregistrat sub 54 de observații din cauza bibliotecilor nevalide.

Analiză calitativă

Concordanța calitativă a definițiilor de variante a fost evaluată separat la cele două niveluri de variante pentru o variantă dată preluată din observațiile grupate pentru toate variabilele (operatori, loturi de reactivi, zile și replici). PPC și PNC, asociate cu un interval de încredere 95% (scor Wilson) sunt rezumate în [Tabelul 68](#) (variante ADN scurte) și [Tabelul 69](#) (fuziuni ARN).

La nivel ridicat de variantă (~2-3x LoD), testul TSO Comprehensive (UE) a demonstrat acord 100% pentru PPC și PNC, pentru toate variantele testate.

La nivel de variantă jos (~1x LoD), PPC pentru variante ADN scurte a fost cuprins în intervalul 83,3%-98,1%, iar PPC pentru fuziunile ARN, în intervalul 90,7%-100%. Pentru variantele care au prezentat PPC < 95%, media VAF (RET C634Y și RET D898_E901del) sau citirile de susținere (NCOA4-RET și BCAN-NTRK1) s-au aflat sub respectivele limite de detecție. La nivel de variantă redus, s-a obținut PNC 100% pentru toate variantele.

Tabelul 68 Rezultate calitative pentru variante ADN țintite

Nivel de variantă	Variantă	Tip de variantă	VAF medie	PPC (%) (n/N) (ÎI 95%)	PNC (%) (n/N) (ÎI 95%)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3, 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	DELEȚIE	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*	DELEȚIE	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Nivel de variantă	Variantă	Tip de variantă	VAF medie	PPC (%) (n/N) (ÎI 95%)	PNC (%) (n/N) (ÎI 95%)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	DELEȚIE	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*	DELEȚIE	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Modificările nucleotidelor sunt prezentate pentru fiecare variantă în secțiunea Limita de detecție, cu excepția RET D631_L633delinsE, însemnând cromozomul 10, poziția 43609940, ACGAGCT de referință, alternativa A.

Tabelul 69 Rezultate calitative pentru fuziuni ARN

Nivel de variantă	Fuziune	Media citirilor de susținere	PPC (%) (n/N) (Î 95%)	PNC (%) (n/N) (Î 95%)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (linie de celule FFPE)	23,1	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	
	KANK1-NTRK3	13,5	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4,100,0)
	NCOA4-RET	13,3	90,7 (49/54) (80,1, 96,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	CCDC6-RET	18,7	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (proba 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (proba 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Nivel de variantă	Fuziune	Media citirilor de susținere	PPC (%) (n/N) (ÎI 95%)	PNC (%) (n/N) (ÎI 95%)
~2-3x LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (linie de celule FFPE)	28,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	
	KANK1-NTRK3	39,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	NCOA4-RET	24,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	CCDC6-RET	Nu se aplică	Nu s-a testat	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (proba 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (proba 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Analiză cantitativă

S-a efectuat analiza componentelor divergenței cu probabilitate maximă restricționată (REML) pentru evaluarea divergenței totale a variabilei continue latente (VAF pentru variante ADN scurte și citiri de susținere pentru fuziuni ARN) și pentru estimarea componentelor preciziei [abatere standard (SD), coeficient de variație (CV)] pentru fiecare sursă de variație [operatori, instrumente, zile, loturi de reactivi, variație reziduală și totală]. Rezultatele sunt prezentate în [Tabelul 70](#) pentru variantele ADN scurte și în [Tabelul 71](#) pentru fuziunile ARN.

Variația VAF a crescut proporțional cu media, conform estimărilor pentru proporționalitate binomială. Variația citirilor de susținere a crescut proporțional cu media, conform estimărilor pentru datele numerice. Componenta

reziduală a prezentat contribuția cea mai ridicată la divergența totală atât variantele ADN scurte, cât și pentru fuziunile ARN la ambele niveluri, susținând astfel concluzia că detecția acestor variante cu TSO Comprehensive (UE) este robustă indiferent de operator, lot, instrument și zi.

Tabelul 70 Rezultate SD și CV cantitative pentru variantele ADN scurte țintite

Nivel VAF	Variantă	Tip de variantă	N tentative valide	VAF medie	SD operator (% CV)	SD instrument (%CV)	SD lot (%CV)	SD zi (%CV)	SD reziduală (%CV)	SD total (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELEȚIE	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	DELEȚIE	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
~3x LoD	RET D898_E901del	DELEȚIE	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	DELEȚIE	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)

Tabelul 71 Rezultate SD și CV cantitative pentru fuziunile ARN țintite

Nivel citiri de susținere	Fuziune	N tentative valide	Media citirilor de susținere	SD operator (% CV)	SD instrument (%CV)	SD lot (%CV)	SD zi (%CV)	SD reziduală (%CV)	SD total (%CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (linie de celule)	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 (Proba 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (Proba 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Nivel citiri de susținere	Fuziune	N tentative valide	Media citirilor de susținere	SD operator (% CV)	SD instrument (%CV)	SD lot (%CV)	SD zi (%CV)	SD reziduală (%CV)	SD total (%CV)
2-3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (linie de celule)	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 (Proba 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (Proba 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Studiul 2

Precizia intra-laborator a fost evaluată pentru încărcătura mutațională tumorală (tumour mutational burden/TMB) și instabilitatea microsatelitară (microsatellite instability/MSI). S-au utilizat, pentru evaluarea preciziei la diferite niveluri din întregul interval de scoruri, pentru NSCLC, cinci specimene FFPE de ADN pentru NSCLC și, pentru CRC, șapte specimene FFPE pentru MSI, atât cu stabilitate MS, cât și cu MSI-high. Fiecare specimen a fost rulat în regim duplicat pe trei instrumente NextSeq 550Dx de trei (3) operatori, în trei (3) zile, cu trei (3) pregătiri de biblioteci pentru trei (3) loturi de reactivi, generându-se 54 de observații/nivel.

Acordul calitativ a fost evaluat pentru statusul MSI. Testul TSO Comprehensive (UE) a demonstrat concordanță de 100% la determinările procentual pozitive și procentual negative pentru statusul MSI. Testul TSO Comprehensive (UE) raportează scorul TMB pentru TMB, concordanța calitativă nefiind aplicabilă.

Variația totală a scorurilor TMB și MSI, împreună cu contribuțiile defalcate pe surse (instrumente, operatori, loturi, zile și reziduale) a fost cuantificată un model al divergențelor componentelor într-o gamă de scoruri. Abaterea standard (SD) și coeficientul de variație (CV) sunt prezentate în [Tabelul 72](#) pentru TMB și în [Tabelul 73](#) pentru MSI, pe niveluri. Unele niveluri au înregistrat sub 54 de observații din cauza bibliotecilor nevalide.

Tabelul 72 SD pentru scorul TMB cantitativ și rezultatele CV

Level (Nivel)	Scor TMB mediu	N tentative valide	SD operator (% CV)	SD instrument (%CV)	SD lot (%CV)	SD zi (%CV)	DS reziduală (%CV)	AS totală (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Tabelul 73 SD pentru scorul MSI cantitativ și rezultatele CV

Status MSI	Level (Nivel)	Scor MSI mediu (%)	N tentative valide	SD operator (%CV)	SD instrument (%CV)	SD lot (%CV)	SD zi (%CV)	SD reziduală (%CV)	AS totală (%CV)
Stabilitate MS	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-high	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

Variația scorurilor TMB tinde să crească proporțional cu media, conform rezultatelor scontate pe baza distribuției teoretice ale datelor numerice. Variația scorurilor MSI pentru nivelurile apropiate de scor MSI = 50 sunt mai mari decât variația scorurilor MSI la niveluri apropiate de 0 sau 100, fiind consecventă cu variabilitatea pe baza distribuției teoretice a datelor proporționale. Componenta reziduală și-a menținut contribuția cea mai ridicată la divergența totală atât pentru scorurile MSI, cât și pentru scorurile TMB, susținând astfel concluzia că scorurile sunt robuste indiferent de operator, lot, instrument și zi. Totuși, deoarece atât MSI, cât și TMB sunt biomarkeri complecși, performanțele analitice pot varia de la un specimen la altul. Aceasta înseamnă că variația TMB nu depinde doar de valoarea TMB, ci și de componența variantelor din specimen cum sunt tipul de variantă (SNV, Indel) și nivelul frecvenței alelelor variantei (VAF) (proximitatea față de valoarea limită de includere). De asemenea, variația MSI depinde nu doar de valoarea MSI, ci și de componența locațiilor din specimen, cum sunt numărul de locații instabile și numărul de instabilități/locație.

Valorile C5 și C95 aproximativ la valoarea limită de 20,00% au fost determinate pentru MSI printr-un profil de precizie (Tabelul 74).

Tabelul 74 Interval C5-C95 pentru MSI

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

A fost evaluat impactul conținutului tumoral asupra scorurilor TMB și MSI. În cazul majorității specimenelor, conținutul $\geq 30\%$ a afectat în măsură neglijabilă scorurile TMB la peste 10 mutații/megabază. Scorurile TMB au rămas relativ neschimbate o dată cu creșterea cantității de conținut tumoral. Pentru speciemenle cu MSI-High, conținutul tumoral a prezentat o corelație pozitivă, lineară, cu scorul MSI. Speciemenle cu MSI-High și-au menținut nivelul ridicat al instabilității, în medie, pentru conținut tumoral $\geq 30\%$. Speciemenle de endometru s-au comportat semnificativ diferit față de alte tipuri de țesuturi și s-a determinat că necesită o cantitate mai ridicată de conținut tumoral pentru a putea fi declarate cu MSI-High.

Acuratețea în analiza profilului tumoral

Detecția variantelor cu testul TSO Comprehensive (UE) a fost comparată cu rezultatele metodelor de referință. Variantele ADN scurte și TMB au fost comparate cu o metodă externă NGS de secvențiere completă de exom validată. Amplificările de gene au fost comparate cu aceeași metodă de secvențiere completă de exom NGS sau

cu o metodă de hibridizare duală in situ (DISH) pentru amplificările HER2. MSI s-a evaluat în comparație cu un test MSI-PCR validat. Variantele ARN splice au fost comparate cu o metodă PCR cantitativă (qPCR) validată. Fuziunile ROS1 și ALK au fost comparate cu teste FISH validate. Toate celelalte fuziuni au fost comparate cu o metodă compozită, constând din secvențierea completă de exom cu grup NGS (RNGS1), cu grup de fuziuni țintit NGS (RNGS2) și PCR digitală cu picături fine (ddPCR).

Detecția variantelor ADN scurte

Detecția variantelor ADN scurte cu testul TSO Comprehensive (UE) a fost comparată cu rezultatele secvențierii complete de exom (WES), comparându-se WES cu perechi din specimene tumorale corespondente normale pentru definirea de variante gametice și somatice de variante scurte. Comparația dintre variantele mici, constând din variante mononucleotidice (SNV), inserții și deleții, s-a bazat pe 124 de specimene din 14 tipuri diferite de țesut care au fost valide atât pentru TSO Comprehensive (UE), cât și pentru WES. TSO Comprehensive (UE), dar nu și analiza WES, poate detecta variante multinucleotidice (MNV, 2–3 bp) care necesită fazare. TSO Comprehensive (UE) Variantele multinucleotidice (MNV) au fost evaluate ca SNV individuale în raport cu WES. Un rezumat al acordului la nivel de variantă, incluzând acordul procentual pozitiv (PPA) și negativ (NPA) pentru toate definițiile de variante este prezentat în [Tabelul 75](#).

Tabelul 75 Rezumatul acordului pentru definirea de variante scurte, evaluate după statutul gametic sau somatic

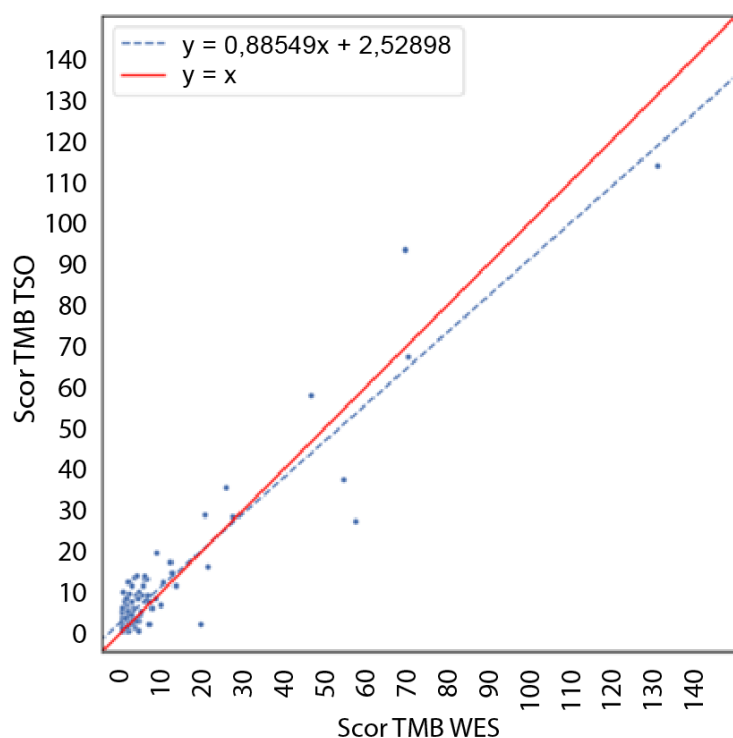
	Definire de variante somatice, WES	Definire WES Germline	Variante nedefinite, WES
TSO Comprehensive (UE) definită	382	33,163	426
TSO Comprehensive (UE) nedefinită	69	61	70,000,481
Totală	451	33,224	70,000,907
Acord procentual	PPA: 85% (382/451), Î 95%: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33.163/33.224) Î 95%: [99,8%, 99,9%]	NPA: > 99% (70.000.481/70.000.907) Î 95%: [99,999% - 99,999%]

În total, TSO Comprehensive (UE) a definit 426 de variante nedetectate prin metoda WES. Două sute patru (48%) din aceste variante au prezentat frecvență a alelelor variantei sub pragul de definire cu metoda WES. Pentru restul variantelor cu rezultate potențial fals pozitive, există dovezi slabe ale definirii variantelor prin metoda WES. De asemenea, multe din variante au prezentat dovezi slabe prin metoda WES în specimenele corespondente normale. Acest rezultat sugerează că respectivele variante au fost ratate în tumori prin WES din cauza tumorii în contaminare normală.

Detecția încărcăturii mutaționale tumorale

Concordanța TMB a fost determinată prin compararea scorurilor TMB (mutații somatice/megabază) obținute cu metoda WES și cu TSO Comprehensive (UE) pentru 124 de specimene pentru care sunt disponibile date obținute atât cu TSO Comprehensive (UE), cât și cu metoda WES. Analiza regresiei liniare cu metoda WES ca factor de predicție a prezentat interceptare pe axa y de 2,53, pantă de 0,89 și coeficient de corelare Pearson de 0,94 (Figura 3).

Figura 3 Corelarea scorului TMB între WES și TSO Comprehensive (UE)



Detecția amplificării de gene

Detecția amplificărilor de gene cu TSO Comprehensive (UE) a fost comparată cu rezultatele aceluiași test WES, utilizând specimene tumorale corespondente normale pentru testare sau doar specimene tumorale. În total, s-au testat 420 de specimene, din care 183 cu metoda ortogonală pentru specimene tumorale/normale și 237 cu metoda pentru specimene exclusiv tumorale. Din cele 420 de probe, 50 de probe au fost selectate pentru studiu deoarece au fost pozitive la amplificare cu TSO Comprehensive (UE) sau o analiză predecesoare. Performanța pentru aceste probe caracterizate a fost ajustată utilizând o prevalență medie a fuziunii. Performanța combinată pentru probele caracterizate și necaracterizate a utilizat o medie ponderată pentru varianță inversă. Specimenele au provenit din 14 tipuri de țesuturi și au conținut amplificări de la 55 de gene. TSO Comprehensive (UE) raportează amplificări ale genelor MET și ERBB2. Totuși, precizia a fost evaluată pentru toate cele 55 de gene. Rezumatul determinărilor de amplificări de gene este prezentat în [Tabelul 76](#).

Tabelul 76 Rezumatul concordanței pentru amplificările genetice

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

* Interval de încredere calculat prin bootstrap.

Amplificările de gene ERBB2 (HER2) în țesuturi gastrice și mamare au fost analizate separat de celelalte amplificări de gene, cu metoda de hibridizare duală in situ (DISH). În total s-au testat 116 specimene de țesut mamar și gastric, din care 64 prezentaseră anterior rezultate pozitive pentru HER2 cu metodele IHC sau FISH. Pentru un specimen a eșuat extracția, pentru 4, validitatea pentru TSO Comprehensive (UE) și pentru 3, validitatea pentru DISH. Din cele 108 specimene, 20 (18,5%) au prezentat scoruri (între 1,5 și 2,5) aproape de valoarea limită DISH de 2,0. Rezultatele concordanței, incluzând PPA și NPA pentru toate speciemenle, inclusiv cu excluderea cazurilor HER2 la limita DISH sunt prezentate în [Tabelul 77](#).

Tabelul 77 Rezumatul concordanței între rezultatele cu TSO Comprehensive și HER2 DISH, inclusiv pentru amplificare de gene HER2

Amplificare de gene HER2 Toate (de sân și gastric)	HER2 DISH cu amplificare	HER2 DISH fără amplificare
TSO Comprehensive (UE) pozitive	17 (inclusiv 1 la limită)	13 (inclusiv 1 la limită)
TSO Comprehensive (UE) negative	10 (inclusiv 6 la limită)	68 (inclusiv 12 la limită)
Acord procentual, cu includerea cazurilor la limită	PPA: 63% (17/27) Î 95%: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) Î 95%: [74%, 90%]
Acord procentual, cu excluderea cazurilor la limită	PPA: 80% (16/20) Î 95%: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) Î 95%: [72%, 90%]

Detecția instabilității microsatelitare

Detecția instabilității microsatelitare cu TSO Comprehensive (UE) a fost comparată cu rezultatele unui test MSI-PCR care utilizează specimene tumorale corespondente normale pentru testare. S-au comparat 195 de specimene, cu respectarea cerinței de conținut tumoral $\geq 30\%$ (pentru statutul ;S-stabil), reprezentând 14 tipuri de țesuturi. MSI-PCR evaluează 5 locații și are 3 rezultate - MSI-Stabil (fără locații instabile), MSI-Low (o locație instabilă) și MSI-High (două sau mai multe locații instabile). TSO Comprehensive (UE) evaluează până la 130 de locații microsatelitare și clasifică probele numai ca MSS sau MSI-High ($\geq 20\%$ locații instabile). Rezultatele MSI-Low și MS-Stabil au fost grupate pentru MSI-PCR. Analiza concordanței este prezentată în [Tabelul 78](#).

Tabelul 78 Rezumatul analizei concordanței între TSO Comprehensive (UE) și MSI-PCR pentru instabilitate microsatelitară ADN

Status MSI	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSI-stabil
TSO Comprehensive (UE) Instabil (MSI-Ridicat)	41	2	0
TSO Comprehensive (UE) Stabil (Stabilitate MS)	3	0	150
Total	44	2	150
Acord procentual	PPA: 93% (41/44) Î 95%: [82%, 98%]	NPA: 99% (150/152) Î 95%: [95%, >99%]	

Detecția variantelor ARN splice

Precizia detecției variantelor splice a fost calculată comparând rezultatele TSO Comprehensive (UE) cu rezultatele testelor qPCR pentru EGFRvIII și Met Exon 14del, incluzând un rezultat ARN pozitiv cunoscut pentru fiecare variantă splice. Analiza concordanței s-a efectuat pe un total de 230 specimene ARN unice din 14 tipuri de țesuturi cu date disponibile, atât cu TSO Comprehensive (UE), cât și cu metoda de referință. Toate speci­me­nele au fost testate pentru MET Exon 14 del, iar speci­me­nele EGFRvIII au fost testate doar în țesut cerebral. Trei speci­me­ne detectate ca pozitive pentru MET Exon14 del cu qPCR, dar nu și cu TSO Comprehensive (UE), au înregistrat Ct mediu > 37, sub nivelul LoD al TSO Comprehensive (UE). Rezultatele studiului concordanței sunt rezumate în [Tabelul 79](#).

Tabelul 79 Rezumatul analizei concordanței între TSO Comprehensive (UE) și qPCR pentru variante ARN splice

Variante ARN splice	Pozitive, qPCR	Negative, qPCR
TSO Comprehensive (UE) pozitive (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (UE) negative (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (UE) pozitive (MET exon 14 skipping)	1	0
TSO Comprehensive (UE) negative (MET exon 14 skipping)	3	217
Totală	7	230
Acord procentual	PPA: 57% (4/7) Î 95%: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) Î 95%: [98%, 100%]

Detecția fuziunilor ARN

Comparație prin metodă compozită

Fuziunile TSO Comprehensive (UE) au fost comparate printr-o metodă compozită constând în secvențierea ARN completă de exom cu grup NGS (RNGS1), cu grup de fuziuni țintit NGS (RNGS2) și PCR digitală cu picături fine (ddPCR).

Metoda RNGS1 constă din suprapunerea cu toate genele pentru care TSO Comprehensive (UE) poate detecta fuziuni. Totuși, limita de detecție a metodei RNGS1 a fost de 4-8 ori mai mare decât a TSO Comprehensive (UE), pe baza numărului de citiri de susținere observate în determinările de fuziuni suprapuse. De aceea, s-au folosit două metode cu sensibilitate mai mare și gamă de fuziuni mai restrânsă împreună cu metoda WES (RNGS1).

S-a testat cu RNGS1 un total de 255 de specimene ARN unice, reprezentând 14 tipuri de țesuturi și conforme cu valorile TSO Comprehensive (UE). Două specimene au fost nevalide pentru QC al specimenelor pentru RNGS1 și au fost excluse de la analizele suplimentare. Din cele 82 de fuziuni determinate cu TSO Comprehensive (UE), 4 au fost excluse din evaluare din cauza eșecurilor la QC RNGS1, încă 7 fuziuni neputând fi determinate din cauza absenței țintelor din grupul RNGS1. Dintre cele 71 de fuziuni rămase determinate de TSO Comprehensive (UE), RNGS1 a confirmat 9 fuziuni. RNGS1 a detectat 4 fuziuni nedeterminate de TSO Comprehensive (UE).

Din cele 62 de fuziuni pozitive cu TSO Comprehensive (UE) și nedetectate prin RNGS1, 13 s-au suprapus cu metoda RNGS2 și au fost confirmate prin aceasta. O fuziune a fost detectată de RNGS2, dar nu și cu TSO Comprehensive (UE).

PCR digital cu picături fine s-a utilizat pentru fuziunile determinate cu TSO Comprehensive (UE), nedeterminate sau imposibil de determinat prin RNGS1 și imposibil de evaluat prin RNGS2 (49). În plus, ddPCR a fost utilizată pentru reevaluarea a 2 din 4 fuziuni cu rezultat fals negativ cu TSO Comprehensive (UE) prin RNGS1 și 2 din 9 fuziuni determinate și cu TSO Comprehensive (UE), și prin RNGS1. Cinci specimene cu fuziuni cu rezultat negativ au fost incluse la testarea fiecărui specimen cu rezultat pozitiv pentru a asigura specificitatea. Optsprezece fuziuni nu au fost testate cu ddPCR din cauza incapacității de a concepe primeri/sonde, a partenerilor genetici multipli pentru fuziuni sau a materialelor FFPE insuficiente. Pentru ddPCR, primerii și sondele s-au conceput pe baza punctelor de întrerupere observate în analiza TSO Comprehensive (UE).

În total, s-au detectat 52 de fuziuni cu ddPCR, din care 41 au fost determinate cu TSO Comprehensive (UE), nefiind determinate sau fiind imposibil de determinat prin RNGS1. ddPCR a determinat nouă fuziuni cu rezultate negative cu TSO Comprehensive (UE) sau prin RNGS1. Două fuziuni cu rezultat pozitiv prin ddPCR au confirmat cele 2 fuziuni determinate și cu TSO Comprehensive (UE), și prin RNGS1. Prin ddPCR nu s-a detectat nici o fuziune pentru cele 2 cu rezultat fals negativ cu TSO Comprehensive (UE) reevaluate cu RNGS1. Totuși, acestea au fost incluse ca fals negative pe baza comparației cu RNGS1.

Din cele 255 de probe, 35 de probe au fost selectate pentru studiu deoarece au fost pozitive la fuziune cu TSO Comprehensive (UE) sau o analiză predecesoare. Performanța pentru aceste probe caracterizate a fost ajustată utilizând o prevalență medie a fuziunii. Performanța combinată pentru probele caracterizate și necaracterizate a utilizat o medie ponderată pentru varianță inversă. Rezultatele concordante prin diferitele metode pentru fuziuni sunt prezentate în [Tabelul 80](#).

Cele 66 de fuziuni (54 de fuziuni unice) concordante conform metodei compozite au reprezentat 43 de gene din grupul TSO Comprehensive (UE). Totuși, sunt eligibile pentru raportare doar fuziunile din cele 23 de gene prezentate în [Tabelul 80](#).

Tabelul 80 Rezumatul concordanței pentru fuziunile ARN

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

* Interval de încredere calculat prin bootstrap.

Comparație cu metoda FISH pentru fuziunile ROS1 și ALK

S-au testat douăzeci și cinci de specimene NSCLC cu metoda FISH, pentru fuziunile ROS1 și ALK, și 5 specimene NSCLC suplimentare pentru fuziunile ROS1. Opt specimene pentru ROS1 au eșuat cu metoda FISH din cauza țesutului inadecvat. TSO Comprehensive (UE) și FISH au detectat două fuziuni ROS1 și o fuziune ALK. Nu s-au observat rezultate discordante. În [Tabelul 81](#) sunt rezumate rezultatele concordante ale metodelor TSO Comprehensive (UE) și FISH pentru fuziunile ROS1 și ALK.

Tabelul 81 Rezumat cu rezultate concordante ale metodelor TSO Comprehensive (UE) și FISH pentru fuziunile ROS1 și ALK

ALK+ROS1	Pozitive, metoda FISH	Negative, metoda FISH
TSO Comprehensive (UE) pozitive	3	0
TSO Comprehensive (UE) negative	0	44
Totală	3	44
Acord procentual	PPA: 100% (3/3) Î 95%: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) Î 95%: [92%, 100%]

Validitatea specimenului

Validitatea specimenului (prima tentativă) s-a măsurat pentru 181 de specimene ARN unice și pentru 272 de specimene ADN unice din blocuri FFPE depozitate ≤ 5 ani. Aceste specimene au fost selectate pe baza tipului de țesut și a materialului disponibil; validitatea analizei a fost necunoscută. Valorile bibliotecii CC trebuie să întrunească criteriile pentru tipul de variantă pentru a fi considerate valide. Validitatea specimenului a fost evaluată separat pentru fiecare din tipurile de variante (variante ADN scurte/TMB, MSI, amplificări de gene, variante cu fuziune/splice), rezultatele fiind prezentate în [Tabelul 82](#). Se preconizează o scădere suplimentară a validității MSI de 1% pentru blocurile FFPE cu vârsta ≤ 2 ani din cauza transportului reactivului.

Tabelul 82 Validitatea specimenului

Tip de variantă	Validitatea specimenului
Variante cu fuziune/splice (ARN)	76%
Variante ADN scurte/TMB	75%
MSI	72%
Amplificare de gene	94%

Rezumatul validării analitice pentru ipotezele de analiză a profilului tumoral

TSO Comprehensive (UE) este validat analitic pentru următoarele, pe baza datelor privind limita de detecție, precizia, reproductibilitate și acuratețea:

- Variante ADN scurte - SNV, MNV, inserții și deleții
- TMB
- MSI
- Amplificări de gene MET și ERBB2 (HER2) (consultați [Tabelul 2](#)).
- 23 de gene pentru care pot fi detectate fuziuni (consultați [Tabelul 2](#)).
- Variante splice EGFR și MET (consultați [Tabelul 2](#)).

Performanța clinică NTRK

Pentru validarea testului TSO Comprehensive (UE) ca test de diagnostic corelat (CDx) pentru selecția pacienților pentru tratament cu VITRAKVI (larotrectinib), s-au testat, în sprijinul unui studiu privind precizia testului TSO Comprehensive (UE) și a studiului comparativ cu extrapolare, specimene de țesuturi de la pacienții înrolați în studiile privind larotrectinibul (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; denumite, colectiv, specimene din studiul larotrectinib), cu dată limită de colectare a datelor 15 IUL 2019, suplimentate cu țesuturi FFPE disponibile pe piață.

NCT02122913 a fost un studiu multicentric, în regim deschis, de fază 1, cu creștere treptată a dozei la pacienți adulți cu tumori de organe pline avansate (de orice tip), neselectați pentru cancere cu rezultate pozitive pentru fuziune NTRK. După finalizarea segmentului de creștere treptată a dozei, s-a inițiat extinderea dozei pentru pacienți cu cancere cu rezultate pozitive pentru fuziune NTRK documentate și pentru pacienții despre care investigatorul a considerat că ar putea beneficia de tratamentul cu un inhibitor TRK cu selectivitate ridicată. NAVIGATE NCT02576431 este un studiu în derulare, multicentric, în regim deschis, de fază 2, pe pacienți cu cancere cu markeri genetici identici, cu vârstă mai mare sau egală cu 12 ani, cu tumori de organe pline avansate recurente și cu fuziune NTRK documentată prin testare într-un laborator extern. SCOUT NCT02637687 este un studiu în derulare, multicentric, în regim deschis, de fază 1/2 pe pacienți cu vârstă între 0 și 21 de ani, cu tumori avansate de organe pline sau ale sistemului nervos central (SNC).

Din pacienții cu rezultate pozitiv pentru fuziune NTRK incluși în studiul TSO Comprehensive (UE), 164 au format setul de pacienți pentru eficacitatea primară extinsă a larotrectinibului (ePAS4).

Studiu privind precizia în detectarea fuziunilor NTRK1, NTRK2, NTRK3

Precizia testului TSO Comprehensive (UE) în detectarea fuziunilor NTRK (NTRK1, NTRK2 sau NTRK3) la pacienții cu tumori de organe pline s-a demonstrat prin evaluarea acordului rezultatelor privind fuziunile NTRK între TSO Comprehensive (UE) și o metodă ortogonală validată bazată pe NGS.

S-a efectuat un studiu retrospectiv, neintervențional. Specimenele dintr-un studiu privind larotrectinibul și specimene suplimentare au fost testate cu testul TSO Comprehensive (UE) într-un centru extern și cu metoda ortogonală într-un laborator central. Precizia testului TSO Comprehensive (UE) în determinarea fuziunilor NTRK a fost estimată comparativ cu metoda ortogonală; s-au calculat acordul procentual pozitiv (PPA) și negativ (NPA) și intervalele de încredere (ÎI) 95% bilaterale conexe.

S-au testat cu TSO Comprehensive (UE) și/sau metoda ortogonală 516 specimene. Din aceste specimene, 499 au fost testate cu ambele metode. Șaptesprezece din cele 516 nu au fost testate cu una din metode din cauza extracției eșuate, din motive necunoscute (pentru metoda ortogonală) sau a devierii de la protocol. Din cele 499 de specimene testate cu ambele metode, 170 (34,1%) au fost specimene din studiul privind larotrectinibul și 329 (65,9%) au fost specimene suplimentare.

Clasificarea tabelară încrucișată a celor 499 de probe este prezentată în [Tabelul 83](#). Din cele 499 de specimene, 85 au prezentat rezultate nevalide cu TSO Comprehensive (UE); dintre cele 85, 53 au prezentat rezultate nevalide și prin metoda ortogonală. Încă șapte specimene au prezentat rezultate nevalide prin metoda ortogonală. Așadar, 407 din 499 au prezentat rezultate valide prin ambele metode.

Tabelul 83 Studiul privind precizia în detectare pentru NTRK: Clasificarea tabelară încrucișată a rezultatelor TSO Comprehensive (UE) în comparație cu rezultatele prin metoda ortogonală pentru detecția fuziunilor NTRK

Rezultatul testului TSO Comprehensive (UE)	Rezultate, metoda ortogonală			
	NTRK , pozitiv pentru fuziune	NTRK , negativ pentru fuziune	Nevalid	Totală
NTRK, pozitiv pentru fuziune	114	16	1	131
NTRK, negativ pentru fuziune	4	273	6	283
Nevalide*	4	28	53	85
Totală	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (UE) Rezultatele nevalide cu provin de la nivel de specimen și ciclu.

Analizele acordului, cu excluderea și includerea rezultatelor TSO Comprehensive (UE) nevalide sunt prezentate în [Tabelul 84](#). Cu excluderea rezultatelor TSO Comprehensive (UE) nevalide, PPA a fost 96,6% (114/118, ÎI 95%: 91,5% - 99,1%), iar PPA, 94,5% (273/289; ÎI 95%: 91,2% - 96,8%).

Tabelul 84 Studiul privind precizia în detectare pentru NTRK: PPA și NPA pentru TSO Comprehensive (UE) în comparație cu metoda ortogonală în detectarea fuziunilor NTRK

Nivelul de acord	Excluderea rezultatelor nevalide ale testului TSO Comprehensive (UE)		Includerea rezultatelor nevalide ale testului TSO Comprehensive (UE)	
	Acord, % (n/N)	ÎI 95%*	Acord, % (n/N)	ÎI 95%*
PPA	96,6 (114/118)	91,5, 99,1	93,4 (114/122)	87,5, 97,1
NPA	94,5 (273/289)	91,2, 96,8	86,1 (273/317)	81,8, 89,7

* ÎI 95% pe baza metodei Clopper-Pearson (exactă).

Studiu clinic comparativ cu extrapolare privind detectarea fuziunilor NTRK1, NTRK2, NTRK3

Într-un studiu clinic comparativ cu extrapolare s-a demonstrat validitatea clinică a TSO Comprehensive (UE) în detectarea fuziunilor NTRK1, NTRK2 și NTRK3 la pacienții cu tumori de organe pline care ar putea beneficia de tratament cu larotrectinib. Studiul s-a efectuat pentru evaluarea eficacității clinice a testului TSO Comprehensive (UE) în identificarea pacienților cu rezultate pozitive pentru fuziuni NTRK1, NTRK2 și NTRK3 pentru tratamentul cu larotrectinib și pentru evaluarea concordanței între metodele testului TSO Comprehensive (UE) și testului utilizat pe plan local (LT) (pentru determinarea statusului fuziunilor NTRK pentru studiile clinice despre larotrectinib).

Metodele LT au inclus NGS, hibridizare in situ cu fluorescență (FISH), reacție de polimerizare în lanț (PCR) și teste NanoString. Fuziunile NTRK (ETV6 NTRK3) au fost deduse pentru pacienți cu fibrosarcom infantil cu translocăție ETV6 identificată cu metoda FISH. Majoritatea celor 235 de pacienți din studiul despre larotrectinib cu status al fuziunii NTRK cunoscuți au fost testați prin metode NGS.

Până la data limită 15 IUL 2019 fuseseră înrolați 279 de pacienți. Din cei 279 de pacienți, 208 au prezentat rezultate pozitive pentru fuziune NTRK. Din cei 208 de pacienți cu rezultate pozitive, 164 au format grupul ePAS4 pentru larotrectinib.

Criteriul final primar pentru analiza eficacității larotrectinibului a fost rata de răspuns globală (ORR) conform evaluării comitetului de analiză independent (CCI) a unui set de date grupate din cele 3 studii clinice. ORR s-a evaluat pe baza procentajului de pacienți cu răspuns global optim dintre cei cu răspuns complet sau răspuns parțial confirmate pe baza criteriilor RECIST, versiunea 1.1. ORR pentru ePAS4 larotrectinib a fost 72,6% (ÎI 95% [65,1%, 79,2%]), pacienții incluși având 16 tipuri diferite de tumori.

Contabilizarea specimenelor

Setul de specimene a inclus reprezentarea unei varietăți largi de tipuri de tumori și specimene de la pacienți pediatrici și adulți.

În studiile despre larotrectinib au fost înrolați 279 de pacienți până la 15 IUL 2019. Dintre aceștia, 235 de pacienți prezentau status al fuziunii NTRK cunoscut, determinat cu o metodă LT: 208 au prezentat rezultate pozitive, iar 27, negative. Statusul fuziunilor NTRK a fost necunoscut pentru 44 de pacienți, deoarece nu s-a impus testarea pentru eligibilitate a pacienților în fazele de creștere treptată a dozei din studiile NCT02122913

și SCOUT NCT02637687. Pentru studiul clinic comparativ cu extrapolare pentru testul TSO Comprehensive (UE) s-au considerat eligibile specimene de la pacienții din studiul despre larotrectinib înrolați până la 15 IUL 2019 cu status cunoscut al fuziunii NTRK (208 pacienți cu rezultate pozitive și 27 cu rezultate negative) și specimenele suplimentare cu rezultate negativ pentru fuziune NTRK determinate prin metode LT reprezentative.

Din cele 208 de specimene cu rezultate pozitive din studiul despre larotrectinib, 154 au fost disponibile pentru testare cu TSO Comprehensive (UE). Dintre acestea, 138 au prezentat rezultate valide. Cincisprezece specimene au fost nevalide din cauza eșecului valorilor de calitate pentru secvențierea specimenelor, iar 1 specimen nu a fost testat din cauza unei abateri de la protocol. Din cele 27 de specimene cu rezultate negative din studiul despre larotrectinib, 24 au fost disponibile pentru testare. Dintre acestea, 22 au prezentat rezultate valide la testul TSO Comprehensive (UE). Două specimene au fost nevalide din cauza eșecului valorilor de calitate pentru secvențierea specimenelor.

Au fost trecute prin screening specimene suplimentare prin una din cele două metode LT reprezentative. Au fost procurate și examinate pentru conținut tumoral peste 350 de specimene. Dintre specimenele suplimentare care întruneau cerințele, 266 au fost extrase cu succes și li s-a confirmat statusul fuziunii NTRK negativ printr-o metodă LT reprezentativă. Dintre acestea, 260 de specimene au fost disponibile pentru testare cu TSO Comprehensive (UE), iar 222 au prezentat rezultate valide. 38 de specimene au fost nevalide din cauza eșecului valorilor de secvențiere a specimenelor (n = 25) sau a eșecului ciclului de secvențiere (n = 13). Setul cu rezultate negativ pentru fuziune NTRK s-a compus din 222 de specimene suplimentare și 22 de specimene din studiul despre larotrectinib.

Rezultate concordante

În total, au fost testate 437 de specimene cu TSO Comprehensive (UE). Dintre cei 208 pacienți cu fuziune NTRK pozitivă, 153 au avut specimene disponibile și au fost testați cu TSO Comprehensive (UE), obținând 138 de rezultate valide și 15 rezultate nevalide.

Acordul rezultatelor obținute cu TSO Comprehensive (UE) în relație cu rezultatele metodelor LT, cu și fără rezultatele TSO Comprehensive (UE) nevalide este prezentat în [Tabelul 85](#).

Tabelul 85 Studiu clinic comparativ cu extrapolare pentru NTRK: Acordul între testul TSO Comprehensive (UE) și metodele LT de detecție a fuziunilor NTRK

Nivelul de acord	Excluderea rezultatelor nevalide ale testului TSO Comprehensive (UE)		Includerea rezultatelor nevalide ale testului TSO Comprehensive (UE)	
	% acord (n/N)	Î 95%*	% acord (n/N)	Î 95%*
PPA	89,1 (123/138)	82,7, 93,8	80,4 (123/153)	73,2, 86,4
NPA	96,3 (235/244)	93,1, 98,3	82,7 (235/284)	77,8, 87,0
OPA	93,7 (358/382)	90,8, 95,9	81,9 (358/437)	78,0, 85,4

* Î 95% bilaterale au fost calculate cu metoda Clopper-Pearson (exactă).

Sensibilitatea analizei în raport cu rezultatele lipsă prin TSO Comprehensive (UE) a demonstrat robustețea analizei acordului. Rezultatele lipsă prin TSO Comprehensive (UE) pentru pacienții cu rezultate pozitive pentru fuziuni LT NTRK (n=70) au fost imputate pe baza modelului regresiei logistice. Estimările de acord, inclusiv cele imputate, sunt prezentate în [Tabelul 86](#).

Tabelul 86 Studiu clinic comparativ cu extrapolare pentru NTRK: Acordul între testul TSO Comprehensive (UE) și metodele LT de detecție a fuziunilor NTRK, inclusiv valorile imputate pentru pacienții cu rezultate pozitive pentru LT cu rezultate lipsă prin TSO Comprehensive (UE)

Nivelul de acord	% acord	ÎI 95%*
PPA	85,2	78,6% - 91,7%
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Rezultatele lipsă prin TSO Comprehensive (UE) pentru pacienții cu rezultate negative pentru fuziune LT nu au fost imputate.

* ÎI 95% bilaterale au fost calculate cu metoda Boot a imputării multiple. Metoda imputării multiple Boot este un pas bootstrap încorporat în imputarea multiplă (Schomaker and Heumann 2018).

Acordurile între testul TSO Comprehensive (UE) și LT pe tipuri de metode (de exemplu, ARN NGS, FISH) sunt prezentate în [Tabelul 87](#).

Tabelul 87 Studiu clinic comparativ cu extrapolare pentru NTRK: Acordul între testul TSO Comprehensive (UE) și metodele LT de detecție a fuziunilor NTRK pe tipuri de metode LT

Tip de metodă LT	Nivel de acord	% acord (n/N)	ÎI 95% ¹
ADN NGS	PPA	84,2 (32/38)	(68,7, 94,0)
	NPA	88,9 (16/18)	(65,3, 98,6)
	OPA	85,7 (48/56)	(73,8, 93,6)
ARN NGS ²	PPA	91,5 (75/82)	(83,2, 96,5)
	NPA	96,9 (218/225)	(93,7, 98,7)
	OPA	95,4 (293/307)	(92,5, 97,5)
FISH	PPA	80,0 (8/10)	(44,4, 97,5)
	NPA	Nu s-a calculat (1/1)	Nu s-a calculat
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Nu s-a calculat (0/0)	Nu s-a calculat
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Nu s-a calculat: pentru subgrupuri cu număr de specimene < 5 nu s-au calculat statisticile relative la acord.

¹ ÎI 95% bilaterale au fost calculate cu metoda Clopper-Pearson (exactă).

² Include metodele NGS exclusiv pe bază de ARN și pe bază de ADN și ARN.

Din cele 437 de specimene testate cu TSO Comprehensive (UE), 24 au prezentat rezultate discordante prin LT: 15 au prezentat rezultate pozitive prin LT și negative cu TSO Comprehensive (UE), iar 9 au prezentat rezultate negative prin LT și pozitive cu TSO Comprehensive (UE). Din cele 24 de specimene cu rezultate discordante, 8 au fost testată cu o metodă ARN NGS LT, 14 cu o metodă ARN NGS LT și 2 cu FISH.

O metodă NGS validată a confirmat rezultatele TSO Comprehensive (UE) pentru 14 din cele 24 de specimene cu rezultate discordante. Pentru celelalte 10 specimene, rezultatele cu TSO Comprehensive (UE) au fost discordante atât prin LT, cât și prin metoda NGS independentă.

Rezultate privind eficacitatea clinică

În cadrul cohortei ePAS4, eficacitatea larotrectinibului pentru populațiile cu rezultate pozitive cu TSO Comprehensive (UE) și LT (97 de pacienți, ORR=78,4%, ÎI 95% [68,8%, 86,1%]) a fost similară cu eficacitatea larotrectinibului pentru populația ePAS4 totală (164 pacienți, ORR=72,6%, ÎI 95% [65,1%, 79,2%]) (Tabelul 88). Din cei 97 de pacienți cu rezultate pozitive cu TSO Comprehensive (UE) din cadrul ePAS4, 28 (28,9%) au răspuns complet medical/chirurgical, iar 48 (49,5%) au răspuns parțial la tratament.

Din cei 13 pacienți cu rezultate negative cu TSO Comprehensive (UE) și pozitive cu LT, 1 (7,7%) pacient a răspuns complet, iar 2 (15,4%) au răspuns parțial la terapia cu larotrectinib.

Tabelul 88 Studiu clinic comparativ cu extrapolare pentru NTRK: ORR pentru pacienți cu rezultate pozitive cu LT și TSO Comprehensive (UE) în cadrul ePAS4

		LT, pozitiv pentru fuziune N=164	TSO Comprehensive (UE) Pozitiv și LT pozitiv N=97	TSO Comprehensive (UE) Negativ și LT pozitiv N=13
Cel mai bun răspuns, global, n (%)	Răspuns complet	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Răspuns complet chirurgical	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Răspuns parțial	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Boală stabilă	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Boală în evoluție	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Imposibil de evaluat	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Rată de răspuns globală	Număr de pacienți, n	164	97	13
	Număr de pacienți cu CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (ÎI 95%*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Abrevieri: CR = răspuns complet, PR = răspuns parțial, sCR = răspuns complet chirurgical.

* Intervalele de încredere 95% bilaterale au fost calculate cu metoda Clopper-Pearson (exactă).

Lipsesc rezultatele a 54 de pacienți cu TSO Comprehensive (UE).

Datele din acest studiu vin în sprijinul siguranței și eficacității testului TSO Comprehensive (UE) utilizat în identificarea pacienților cu tumori de organe pline cu fuziuni NTRK, care pot fi eligibili pentru tratament cu larotrectinib.

Referințe

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Accesată la 3 octombrie 2016.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Accesată la 3 octombrie 2016.

Istoricul versiunilor

Revizuire	Data	Descrierea modificării
Document nr. 200007789 v08	Mai 2025	S-a eliminat referința la versiunile de software și numerele pieselor. Limitări ale procedurii actualizate: • Informații privind țesutul necrotic. • Informații privind conținutul tumoral MSI. Actualizări: • Nota de subsol NTC se aplică atât bibliotecilor min. cât și celei max. • Echipamentele și materialele enumeră specificațiile centrifugei plăcii și incrementele pipetei. • Calcularea suprasolicitării SPB de la 1,05x la 1,15x. • Terminologie pentru ignorarea exonului 14 del al MET față de exonul 14 al MET. S-a adăugat: • Notă pentru SMB în captura țintelor unu și doi. • Pregătiți-vă pentru introducerea secvenței. • Informații suplimentare despre ultrasonicizare. S-au adăugat clarificări și s-au actualizat rezultatele pentru Caracteristicile de performanță: • Substanțe care interferează. • Precizia pentru profilarea tumorii și validitatea probei. • Limita de detecție a studiilor 1 și 2. • Precizie intralaborator a studiului 1. • Studiul de reproductibilitate 2. • Informații privind stabilitatea bibliotecii și stocarea bibliotecii. • Limita de blanc Actualizări de limbă și gramatică

Revizuire	Data	Descrierea modificării
Nr. document 200007789 v07	Ianuarie 2024	- S-au adăugat informații la Limitările procedurii: - Cerințe privind țesutul necrotic și conținutul tumoral al specimenelor pentru MSI-high și mutațiile somatice conducătoare. - Interferență potențială din cauza hemoglobinei. - Limite de detectare în gena RET și definirea fuziunilor în afara limitelor genelor adnotate. - Delețiile genelor nu sunt raportate. - Actualizare pentru utilizare cu software-ul TSO Comprehensive (UE) Local Run Manager, versiunea 2.3.7. - S-au adăugat informații la echipamentele și materialele necesare, dar care nu au fost furnizate, inclusiv două configurații suplimentare de baie cu ultrasunete. - Informații actualizate privind proba și specimenul: - Conținut de țesut necrotic. - Efectele proteinazei K și ale hemoglobinei. - Depozitarea țesutului FFPE fixat pe lamelă și a acidului nucleic purificat. - S-au adăugat informații pentru a îmbunătăți manipularea reactivului, fluxul de lucru și remedierea erorilor de CC pentru rulare. - S-au adăugat context și claritate la Caracteristicile de performanță: - Contaminarea încrucișată - Evaluarea kitului de extracție a acidului nucleic - Substanțe care interferează - Stabilitatea acidului nucleic și a țesutului FFPE fixat pe lamelă - Performanța clinică NTRK - Actualizări de limbă și gramatică
Document nr. 200007789 v06	Februarie 2023	- Declarații suplimentare în secțiunea Limitări - Actualizări lingvistice pentru respectarea convențiilor, gramaticale și pentru ameliorarea clarității - Corecturi în tabelele 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 - Declarație privind prezența precipitatelor în reactivul FSM - Specificații actualizate pentru ciclul termic și canale în lista Echipamente și materiale
Document nr. 200007789 v05	Septembrie 2022	Studiu 2 actualizat, tabele cu reproductibilitatea

Revizuire	Data	Descrierea modificării
Document nr. 200007789 v04	Iunie 2022	• Adăugire, PN suplimentare pentru modulul de analiză TSO Comprehensive v2.3.5 • Eliminare, PN pentru modulul de analiză TSO Comprehensive v2.3.3 • Actualizare, terminologie în secțiunea Limită de blanc
Document nr. 200007789 v03	Aprilie 2022	• Adăugire, informații despre caracteristicile de performanță pentru fuziunile NTRK • Adăugire, marcajul EXCLUSIV PENTRU EXPORT • Actualizare, declarația privind utilizarea preconizată, prin adăugirea ipotezei NTRK1-3 CDx • Extindere, informații despre componentele produsului prin includerea PN pentru componenta software
Document nr. 200007789 v02	Februarie 2022	• Corectură, eroare în tabelul de referință • Adăugire, limitare conexă variantelor gametice și somatice • Clarificare, limbaj privind detecția amplificării de gene
Document nr. 200007789 v01	Decembrie 2021	• Actualizare, limitările procedurii • Clarificare, specificațiile suportului magnetic și ciclului termic în lista cu echipamente și materiale
Document nr. 200007789 v00	Noiembrie 2021	Versiunea inițială

Brevete și mărci comerciale

Prezentul document și conținutul acestuia constituie proprietatea Illumina, Inc. și a afiliaților săi („Illumina”) și sunt destinate exclusiv pentru utilizarea contractuală de către client în legătură cu folosirea produsului sau produselor descrise în prezentul document și în niciun alt scop. Acest document și conținutul său nu trebuie utilizate sau distribuite pentru niciun alt scop și/sau nici comunicate, divulgate sau reproduse în orice alt mod și în orice formă fără consimțământul prealabil acordat în scris de Illumina. Illumina nu transmite, în temeiul brevetelor sale, al mărcilor sale comerciale, al drepturilor sale de autor sau în temeiul dreptului comun, nicio licență și nici drepturi similare ale oricărui terț prin acest document.

Instrucțiunile din acest document trebuie respectate în mod strict și explicit de către personalul calificat și corespunzător instruit pentru a asigura utilizarea corespunzătoare și în siguranță a produsului descris/produselor descrise în acest document. Înainte de utilizarea acestui produs/acestor produse, întreg conținutul acestui document trebuie citit și înțeles în întregime.

NERESPECTAREA OBLIGAȚIEI DE A CITI COMPLET ȘI DE A RESPECTA ÎN MOD EXPLICIT TOATE INSTRUCȚIUNILE CUPRINSE ÎN PREZENTUL DOCUMENT POATE DUCE LA DETERIORAREA PRODUSULUI SAU PRODUSELOR, LA VĂTĂMAREA PERSOANELOR, INCLUSIV A UTILIZATORILOR SAU A ALTOR PERSOANE ȘI LA DAUNE ALE ALTOR PROPRIETĂȚI ȘI VA ANULA ORICE GARANȚIE APLICABILĂ PRODUSULUI SAU PRODUSELOR.

ILLUMINA NU ÎȘI ASUMĂ NICIO RĂSPUNDERE CARE DECURGE DIN UTILIZAREA INADECVATĂ A PRODUSULUI SAU PRODUSELOR DESCRISE ÎN PREZENTUL DOCUMENT (INCLUSIV A COMPONENTELOR SAU SOFTWARE-ULUI ACESTORA).

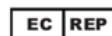
© 2025 Illumina, Inc. Toate drepturile rezervate.

Toate mărcile comerciale sunt proprietatea Illumina, Inc. sau a proprietarilor lor respectivi. Pentru informații specifice privind mărcile comerciale, consultați www.illumina.com/company/legal.html.

Informații de contact



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 S.U.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (în afara Americii de Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Etichetarea produsului

Pentru referințe complete privind simbolurile afișate pe ambalajele și etichetele produselor, consultați legenda simbolurilor la adresa support.illumina.com în fila *Documentation* (Documentație) corespunzătoare setului dvs.