

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Príbalový leták

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO. IBA NA EXPORT.

Zamýšľané použitie

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) je diagnostický test *in vitro*, ktorý využíva cielečné sekvenovanie novej generácie na detekciu variantov v 517 génoch využitím nukleových kyselín extrahovaných zo vzoriek tkaniva tumoru fixovaných vo formalíne a zaliatých v parafíne (FFPE) od pacientov s rakovinou so solídnymi malígnymi novotvarmi pomocou prístroja Illumina® NextSeq™ 550Dx. Tento test je možné použiť na detekciu variantov s jedným nukleotidom, viacerými nukleotidmi, inzercíí, delécií a amplifikácií génov z DNA, ako aj génových fúzií a variantov zostrihu z RNA. Tento test vykazuje aj skóre mutačnej záťaže tumoru (TMB) a stav mikrosatelitnej nestability (MSI).

Test sa používa ako pridružený diagnostický nástroj na identifikáciu pacientov s rakovinou vhodných na liečbu použitím cielenej terapie, ktorú uvádza [Tabuľka 1](#), a to v súlade s označením schváleného terapeutického produktu. Tento test okrem toho poskytuje informácie o profilovaní tumoru slúžiace odbornému zdravotníckemu personálu, ak ho použije v súlade s odbornými pokynmi. Tento test nepredstavuje rozhodný ani inak zaväzujúci nástroj na predpísané použitie akéhokoľvek špecifického liečebného produktu.

Tabuľka 1 Pridružená diagnostická indikácia

Typ tumoru	Biomarkery	Cielečná terapia
Solídne tumory	Fúzie génov NTRK1, NTRK2 a NTRK3	VITRAKVI® (larotreklinib)

Súhrn a vysvetlenie analýzy

Klinický opis

Rakovina je celosvetovo primárnou príčinou úmrtí a môže napadnúť akékoľvek tkanivo.^{1, 2} Analýza genetickej bázy tumoru je dôležitou pomôckou na identifikáciu pacientov, ktorí môžu využiť výhody cielečných terapií, ako aj na vývoj nových spôsobov liečby. Príčinou vzniku alebo súčasťou progresie rakoviny je množstvo génov a mnoho druhov rakoviny v sebe nesie množstvo variantov ovplyvňujúcich tieto gény a ich funkcie. Tieto varianty môžu zahŕňať mutácie génov, ako napríklad jednonukleotidové varianty (SNV), multinukleotidové varianty (MNV), inzercie alebo delécie, amplifikácie génu, fúzie génov a varianty zostrihu. Ďalším následkom mutácií génov rakoviny je prezentácia neoantigénov, ktoré vyvolávajú imunitné reakcie špecifické pre rakovinu. Stav mutácie rakoviny môže byť reprezentovaný TMB a MSI, čo sú genomické podpisy, ktoré súvisia s genomickou nestabilitou a prezentáciou neoantigénov rakoviny.

TruSight Oncology Comprehensive je kvalitatívny test sekvenovania novej generácie (NGS) s komplexným genomickým profilovaním (CGP), ktorý v rozsiahlej miere vyhodnocuje genomické varianty vo veľkom paneli génov súvisiacich s rakovinou uvedených v [Tabuľka 2](#). Táto analýza deteguje malé varianty v 517 génoch, ako aj génové amplifikácie, fúzie a varianty zostrihu, uvedené v [Tabuľka 2](#). Táto analýza poskytuje pokrytie kódovacou sekvenciou pre všetky gény okrem TERT, pri ktorom je pokrytá iba oblasť promotéra, a hodnotí skóre TMB a stav MSI. Tieto ciele analýzy zahŕňajú obsah uvedený profesionálnymi organizáciami a inými hlavnými usmerneniami USA. Dizajn analýzy TSO Comprehensive je ovplyvnený aj nezávislými publikáciami konzorcia a farmaceutickým výskumom v pokročilom štádiu.

Zoznam oblastí vylúčených zo stanovenia variantov nájdete v dokumente *TruSight Oncology Comprehensive Zoznam blokovaných položiek (dokument č. 200009524)*, ktorý je uvedený na [lokalite podpory](#) Illumina.

[Tabuľka 2](#) obsahuje identifikáciu nasledujúcich kategórií typov variantov: malý variant DNA (S), amplifikácia génu (A), fúzia (F) a variant zostrihu (Sp). Malé varianty DNA zahŕňajú SNV, MNV, inzercie a delécie.

Tabuľka 2 TSO Comprehensive (EU) Panel génov analýzy

Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu
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

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

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

Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOC31	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	Max.	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPSR2	S, F

Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa	Nevzfahuje sa

Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID v systéme Entrez	Gén	Typ variantu
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa

Zásady postupu

Analýza TSO Comprehensive (EU) je distribuovaný test, ktorý sa vykonáva manuálnym použitím extrahovanej nukleovej kyseliny ako vstupného materiálu. DNA a/alebo RNA extrahovaná z tkaniva fixovaného vo formalíne a zaliateho v parafíne (FFPE) sa používa na prípravu knižníc, ktoré sú potom obohatené génmi súvisiacimi s rakovinou a sekvenované v prístroji Prístroj NextSeq 550Dx.

Analýza TSO Comprehensive (EU) zahŕňa nasledujúce postupy.

- **Príprava a obohatenie knižnice** – v prípade RNA sa celkovo 40 ng skonvertuje na doplnkovú DNA s dvoma vláknami (cDNA). V prípade genomickej DNA (gDNA) sa 40 ng gDNA štiepi na malé fragmenty. Univerzálne adaptéry na sekvenovanie sa ligujú na fragmenty cDNA a gDNA. Sekvencie adaptéra P5 a P7 sú začlenené do každej knižnice, aby bolo možné zachytiť fragmenty knižnice na povrch prietokového článku počas sekvenovania. Adaptéry obsahujú indexové sekvencie i5 a i7 na identifikáciu každej jednotlivéj vzorky a v prípade knižníc zo vzoriek gDNA sú v nich obsiahnuté jednotlivé molekuly spolu s jedinečnými molekulárnymi identifikátormi (UMI). Knižnice sú následne obohatené špecifickými génmi z oblasti záujmu pomocou metódy zachytenia. Sekvencie biotinylovanej sondy, ktoré obsahujú génové oblasti záujmu, na ktoré cieľi analýza, sa hybridizujú do knižníc. SONDY a hybridizované ciele knižnice sú izolované od necielených knižníc zachytením streptavidínovými magnetickými časticami. Ciele knižnice sú premyté a amplifikované. Množstvo každej obohatenej knižnice je následne normalizované pomocou guľôčok na zaistenie rovnakého zastúpenia v knižniciach združených na sekvenovanie.
- **Sekvenovanie a primárna analýza** – normalizované obohatené knižnice sú následne združené a klastrované na prietokový článok, a následne sekvenované použitím biochemického postupu syntetického sekvenovania (SBS) v prístroji NextSeq 550Dx. Biochemická technológia SBS pomocou metódy reverzibilného terminátora (koncového činidla) deteguje jednotlivé fluorescenčne označené deoxynukleotidové trifosfátové bázy (dNTP) počas ich začleňovania do rastúcich vlákien DNA. Počas každého cyklu sekvenovania je jedna dNTP pridaná do reťazca nukleovej kyseliny. Označenie dNTP slúži ako terminátor polymerizácie. Po každom začlevení dNTP sa zobrazí fluorescenčné farbivo na identifikáciu bázy a potom sa odštiepi, aby bolo umožnené začlenenie ďalšieho nukleotidu. Štyri reverzibilné dNTP naviazané na terminátor (A, G, T a C) existujú ako jednotlivé separátne molekuly. Vďaka tomu prirodzená konkurencia minimalizuje skreslenie začlenenia. Počas primárnej analýzy sa primárne analýzy báz vykonávajú priamo z meraní intenzity signálu počas každého cyklu sekvenovania. Výsledkom je sekvenovanie -po- jednotlivých bázach. Ku každej primárnej analýze báz je priradené skóre kvality.

- **Sekundárna analýza** – Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) sa nachádza v prístroji NextSeq 550Dx ako súčasť softvéru Local Run Manager na zjednodušenie nastavenia chodu TSO Comprehensive (EU) a na vykonanie sekundárnej analýzy výsledkov sekvenovania. Sekundárna analýza zahŕňa validáciu spracovania chodu a kontroly kvality, demultiplexovanie, generovanie súboru FASTQ, zarovnanie a stanovenie variantu. Demultiplexovanie oddeľuje údaje zo združených knižníc na základe jedinečných sekvenačných indexov, ktoré boli pridané počas procedúry prípravy knižnice. Vytvorí sa dočasné súbory FASTQ, ktoré obsahujú sekvenačné čítania pre každú vzorku a skóre kvality, a to okrem čítaní zo všetkých klastrov, ktoré neprešli filtrom. Sekvenačné čítania sú následne zarovnané s referenčným genómom s cieľom identifikovať vzťah medzi sekvenciami, a je im priradené skóre na základe oblastí podobnosti. Zarovnané čítania sú zapísané do súborov vo formáte BAM. Analytický softvér využíva osobitné algoritmy pre knižnice generované zo vzoriek DNA alebo RNA na analýzu malých variantov DNA, amplifikácie génov, TMB a MSI pre vzorky DNA a fúzií a variantov zotrhu v prípade vzoriek RNA. Modul analytického softvéru generuje viacero výstupov vrátane metriky sekvenovania a súborov VCF (Variant Call Format, formát stanovenia variantu). Súbory VCF obsahujú informácie o variantoch nájdených na špecifických pozíciách v referenčnom genóme. Pre každú vzorku sú generované metriky sekvenovania a jednotlivé výstupné súbory. Podrobnosti o sekundárnej a terciárnej analýze nájdete v *Príručke k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661).
- **Terciárna analýza** – terciárna analýza, ktorú vykonáva Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU), sa skladá z výpočtov TMB a MSI, pridruženého diagnostického stanovenia, variantov s profilovaním tumoru do dvoch úrovní klinického významu pomocou databázy Knowledge Base (KB) a typu tkaniva, a generovania správy s výsledkami. Profilovanie tumoru je možné označiť aj ako komplexné genomické profilovanie. Výsledky s interpretovanými variantmi a výsledky biomarkerov TMB a MSI sú zhrnuté v správe s výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU).

Obmedzenia postupu

Len na diagnostické použitie *in vitro*.

- Len na lekársky predpis. Tento test sa musí používať v súlade s nariadeniami klinického laboratória.
- Genomické nálezy uvádzané v [Tabuľka 2](#) v rámci účelu určenia nie sú rozhodujúce pre stanovené použitie akéhokoľvek špecifického terapeutického produktu.
- V prípade variantov uvádzaných v správe s výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU) v častiach Genomické nálezy s dôkazom klinického významu (Úroveň 2) a Genomické nálezy s potenciálnym klinickým významom (Úroveň 3) sa klinická validácia neuskutočnila.
- Rozhodnutia týkajúce sa starostlivosti o pacienta a liečby pacienta musia vychádzať z nezávislého odborného hodnotenia ošetrojúceho lekára, pričom musia byť zohľadnené všetky dostupné informácie týkajúce sa stavu pacienta, ako napríklad anamnéza pacienta a jeho rodiny, fyzické vyšetrenia, informácie z iných diagnostických testov a preferencie pacienta v súlade so štandardom starostlivosti v danej komunite.

- Kvalita vzorky FFPE je veľmi premenlivá. Vzorky, ktoré neprešli štandardnými postupmi fixácie, nemusia generovať extrahované nukleové kyseliny, ktoré spĺňajú požiadavky na kontrolu kvality analýzy ([Kontrola kvality na strane 82](#)). Bloky FFPE, ktoré boli skladované dlhšie než päť rokov, vykazovali nižšiu validitu.
- Účinnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) vo vzorkách získaných od pacientov s transplantáciou orgánu alebo tkaniva nebola hodnotená.
- Vysoké podiely nekrotického tkaniva ($\geq 23\%$) môžu narúšať schopnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) detegovať amplifikácie génov a fúzie RNA.
- Detekcia mutácie somatického stimulačného faktora môže byť nespoľahlivá, ak je obsah tumoru (podľa oblasti) nižší ako 20 %.
- Výsledok stabilnej mikrosatelitnej vzorky (MS-Stable) môže byť nespoľahlivý, ak je obsah tumoru nižší ako 30 %. Výsledok mikrosatelitnej nestabilnej vzorky (MSI-High) je správny bez ohľadu na obsah tumoru.
- Hemoglobín spojený s tkanivom znižuje podporné čítania pre varianty zostrihu MET.
- Vo veľmi preusporiadaných genómoch s deléciami a stratou heterozygotnosti môže softvér TSO Comprehensive (EU) chybné klasifikovať vzorku DNA ako kontaminovanú (CONTAMINATION_SCORE > 3106 a hodnota $p > 0,049$).
- Negatívny výsledok nevylučuje prítomnosť mutácie pod detekčným limitom (LoD) analýzy.
- Citlivosť detekcie malých variantov DNA môže byť ovplyvnená nasledujúcimi faktormi:
 - genomický kontext s nízkou komplexnosťou,
 - narastajúca dĺžka variantu.
- Skóre TMB môžu byť v nasledujúcich kontextoch nepresné:
 - ak obsah tumoru dosahuje úroveň, na ktorých konvergujú frekvencie alel zárodočného a somatického variantu (VAF),
 - v populáciách, ktoré nie sú dostatočne zastúpené vo verejných databázach.
- Amplifikácie génov sú jediné varianty počtu kópií vykazované analýzou TSO Comprehensive (EU). Delécie génov nie sú analýzou hlásené.
- Algoritmy stanovenia fúzií v analytickom softvéri TSO Comprehensive (EU) nemusia brať do úvahy dôkazy z čítaní, ktoré siahajú mimo anotovaných hraníc génov.
- Citlivosť detekcie fúzií môže byť ovplyvnená nasledujúcimi okolnosťami:
 - nízkou komplexnosťou knižnice, výsledkom čoho je nižší podiel podporných čítaní v dôsledku odchýlok od pracovného postupu analýzy (napríklad dodržiavajte kroky miešania v časti [Denaturácia a hybridizácia \(annealing\) RNA na strane 45](#)),
 - keď jeden gén obsiahne obidva body zlomu,
 - v prípadoch, v ktorých sa niekoľko zlomových bodov fúzie nachádza blízko seba s jedným alebo viacerými partnermi, uvedené body zlomu a partneri sa môžu vykazovať ako jeden bod zlomu a partner,
 - malými mediánovými veľkosťami inzercie – vyžaduje sa minimálna mediánová veľkosť inzercie 80 bp, citlivosť sa však znižuje v rozsahu 80 – 100 bp,

- malou komplexnosťou sekvencie alebo homológym genomickým kontextom okolo bodov zlomu.
- Rozlíšenie génov zahrnutých do fúzie môže byť ovplyvnené vtedy, keď sa body zlomu fúzie vyskytujú v genomických oblastiach obsahujúcich prekrývajúce sa gény. Analýza bude vykazovať všetky gény oddelené bodkočiarkami v prípade, že bod zlomu prekrýva viacero génov.
- Nekonzistentné pokrytie v oblasti promotéra TERT môže v dôsledku nízkej hĺbky sekvenovania viesť k nulovému výsledku.
- Anotácia alebo chyby databázy KB môžu spôsobiť výskyt falošne pozitívneho alebo falošne negatívneho výsledku vrátane uvedenia variantu na nesprávnej úrovni (medzi genomickými nálezmi s dôkazom klinického významu [Úroveň 2] a genomickými nálezmi s potenciálnym klinickým významom [Úroveň 3]), alebo môžu byť informácie anotácie v správe nesprávne. Chyby v anotácii alebo v databáze KB nemajú vplyv na varianty vykazované v časti Výsledky CDx. Možnosť výskytu chyby má nasledujúce tri zdroje:
 - Anotácia variantu TSO Comprehensive (EU). Miera výskytu chyby je približne 0,0027 %, a to na základe analýzy 2 448 350 variantov z modulu COSMIC v92, čo znamená, že možnosť výskytu chyby je nízka.
 - Chyba databázy KB v dôsledku procesu kategorizácie.
 - Relevantnosť obsahu KB sa v čase mení. Táto správa reflektuje poznatky v čase spracovania danej verzie KB.
- Analýza TSO Comprehensive (EU) je navrhnutá tak, aby vykazovala somatické varianty pri vykazovaní variantov s dôkazom klinického významu alebo varianty s potenciálnym klinickým významom. Keďže ide o test zameriavajúci sa iba na tumory, vykazovanie zárodočných (zdedených) variantov je možné, ale neúmyselné. Analýza TSO Comprehensive (EU) využíva databázu KB na vykazovanie variantov bez výslovnej anotácie, či majú zárodočný alebo somatický pôvod.
- Databáza KB obsahuje iba terapeutické, diagnostické a prognostické asociácie, ktoré sú relevantné pre varianty v rámci zistenej solídnej zhubnej neoplazmy. Asociácie náchylnosti alebo rizika rakoviny nie sú zahrnuté do databázy KB.
- Nasledujúca tabuľka zobrazuje zmeny nukleotidov pre tri varianty RET, ktoré analýza nedokáže detegovať. Ďalšie zmeny nukleotidov môžu byť detegované pre tú istú zmenu aminokyseliny.

Tabuľka 3 Zmeny nukleotidov pre tri varianty RET

Zmena aminokyseliny	Chr*	Pozícia	Referenčná alela	Alternatíva
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA KAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

* Chr = chromozóm

Komponenty produktu

Test TSO Comprehensive (EU) pozostáva z nasledujúcich komponentov:

- Súprava TruSight Oncology Comprehensive (EU) (katalógové č. Illumina 20063092) – súprava obsahuje reagentie s dostatočným objemom na generovanie 24 knižníc DNA a 24 knižníc RNA. Tento objem zahŕňa vzorky pacientov a kontroly. Kontroly sa predávajú osobitne (pozrite si časť [Požadované reagentie, ktoré sa nedodávajú na strane 17](#)).
- Databáza Knowledge Base: Pravidelne aktualizovaná, k dispozícii na stiahnutie na portáli Lighthouse Illumina.
- Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (katalógové č. Illumina 20051843), ktoré obsahuje nasledujúce komponenty:
 - Balíky Claims Packages TSO Comprehensive
 - Softvérový balík TSO Comprehensive
 - Súprava USB TSO Comprehensive

Servisný zástupca Illumina nainštaluje príslušnú verziu softvéru Analytický modul TSO Comprehensive (EU) do prístroja Local Run Manager Prístroj NextSeq 550Dx. Informácie o analytickom module nájdete v časti Príručka k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661).

Reagencie

Dodávané reagencie

So súpravou TSO Comprehensive (EU) sa dodávajú nasledujúce reagencie.

Súprava na prípravu knižnice TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, č. položky 20031127

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli, DNA polymerase (DNA polymerázu), RNázu H a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli a náhodné hexaméry	-25 °C až -15 °C
Reverse transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci reverse transcriptase	-25 °C až -15 °C

Súprava na prípravu knižnice TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), č. položky 20031118

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci T4 DNA polymerase (DNA polymerázu) a polynukleotidovú kinázu	-25 °C až -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	-25 °C až -15 °C
DNA ligase 3 (LIG 3)	20031438	2	190 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci ligázu	-25 °C až -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci univerzálne sekvenačné oligonukleotidy	-25 °C až -15 °C
UMI adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci univerzálne sekvenačné oligonukleotidy	-25 °C až -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	-25 °C až -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci DNA polymerase (DNA polymerázu) a nukleotidy	-25 °C až -15 °C

Súprava TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), č. položky 20031119

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	2 °C až 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodný roztok obsahujúci magnetické guľôčky	2 °C až 8 °C
Pufer TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Roztok Tris EDTA	2 °C až 8 °C

Indexovacie priméry TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

Aktívne látky: pufrovaný vodný roztok obsahujúci samostatné oligonukleotidové priméry označené čiarovým kódom.



UPOZORNENIE

Priméry UPxx (Unique Index Primers) použite pre vzorky RNA alebo DNA. Nekombinujte spolu indexovacie priméry CPxx a UPxx v rovnakej knižnici.

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

Indexovacie priméry TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Aktívne látky: pufrovaný vodný roztok obsahujúci samostatné oligonukleotidové priméry označené čiarovým kódom.



UPOZORNENIE

Kombinatorické indexovacie priméry (CPxx) používajte výlučne pre vzorky DNA. Nekombinujte spolu indexovacie priméry CPxx a UPxx v rovnakej knižnici.

Indexovací primér	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Index i7	Sekvenovanie	Index i5	Sekvenovanie	Teplota pri uskladnení
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C -25 °C až -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C -25 °C až -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C

Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), č. položky 20031123

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Pufer Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci formamid a soli	2 °C až 8 °C

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli a paramagnetické guľôčky v pevnej fáze, ktoré sú kovalentne pokryté streptavidínom	2 °C až 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Roztok hydroxidu sodného	2 °C až 8 °C
Pufer Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Pufrovaný vodný roztok	2 °C až 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci paramagnetické guľôčky v pevnej fáze	2 °C až 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli, 2-merkaptotanol a formamid	2 °C až 8 °C
Pufer Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	2 °C až 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	2 °C až 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodný roztok obsahujúci magnetické guľôčky	2 °C až 8 °C

Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), č. položky 20031121

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci oligonukleotidy	-25 °C až -15 °C

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	-25 °C až -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci detergent	-25 °C až -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci DNA polymerase (DNA polymerázu) a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci priméry P5 a P7	-25 °C až -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli, 2- merkaptotanol a formamid	-25 °C až -15 °C
PhiX internal control (PX3 alebo PhiX)	20031492	1	10 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci genomickú DNA ako knižnicu PhiX	-25 °C až -15 °C

Súprava TruSight Oncology Comp Content Set, č. položky 20031122

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Oncology RNA Probe Pool 1 (OPR1)	20031494	1	290 µl	Pool oligonukleotidových sond	-25 °C až -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Pool oligonukleotidových sond	-25 °C až -15 °C

Požadované reagenty, ktoré sa nedodávajú

Reagenty používané pred amplifikáciou

- Reagenty na extrakciu a purifikáciu DNA a RNA – informácie o požiadavkách na reagenty nájdete v časti [Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28](#).

- Reagencie na kvantifikáciu DNA a RNA – informácie o požiadavkách na reagencie nájdete v časti [Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28](#).
- Kontroly TruSight Oncology:
 - Kontrola DNA TruSight Oncology (katalógové č. Illumina 20065041)
 - Kontrola RNA TruSight Oncology (katalógové č. Illumina 20065042)
- Etanol (EtOH) 100 % (kategória 200), vhodné na molekulárnu mikrobiológiu
- RNase/DNase-free water

Reagencie používané po amplifikácii

- Súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 cyklov), (katalógové číslo Illumina 20028871)
 - Kazeta s prietokovými článkami NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 cyklov)
 - Kazeta s reagensiami NextSeq 550Dx High Output v2 (300 cyklov)
 - Kazeta s pufrom NextSeq 550Dx v2 (300 cyklov)
- EtOH 100 % (kategória 200), trieda vhodná na molekulárnu mikrobiológiu
- RNase/DNase-free water

Skladovanie reagensí a manipulácia s nimi

Nasledujúce balenia reagensí sa dodávajú zmrazené. Skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C.

Balenie	Číslo dielu	Oblasť laboratória
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Po amplifikácii
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Po amplifikácii



UPOZORNENIE

Reagencie nechovávajú v beznámrazovej- skladovacej jednotke ani vo dverách chladničky.

Nasledujúce balenia reagensí sa dodávajú s gélovými vreckami na zachovanie teploty v rozsahu od 0 °C do 10 °C. Skladujte ich pri teplote 2 °C až 8 °C.

Balenie	Číslo dielu	Oblasť laboratória
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Po amplifikácii



UPOZORNENIE

Reagencie obsahujúce guľôčky (LNB1, SPB a SMB) nezmrazujte.

- Zmeny vo fyzickom vzhľade reagensí môžu naznačovať zhoršenie kvality materiálov. Ak dôjde ku zmenám fyzického vzhľadu (napríklad zmeny farby alebo zakalenie), reagencie nepoužívajte.
- FSM, SSM, ERA1-B a TCB1 môžu obsahovať častice súvisiace s produktom. Pri manipulácii s každou reagensiou dodržiavajte špecifické pokyny. Po vykonaní krokov premiešania FSM a SSM nebudú mať zostávajúce biele častice súvisiace s produktom vplyv na účinnosť.
- Stabilita analýzy TSO Comprehensive (EU) bola hodnotená a jej účinnosť je zachovaná počas štyroch použití súpravy. Reagencie sú stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na označení balenia, ak sú skladované pri predpísaných teplotách.

Vybavenie a materiály

Požadované, ale nedodávané zariadenia a materiály

Zariadenia a materiály pred amplifikáciou

Zariadenia	Dodávateľ
Ultrazvukový prístroj so súvisiacim príslušenstvom Pozrite si časť Nastavenia konfigurácie ultrazvukového prístroja na fragmentáciu DNA na strane 23 .	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Tepelný cyklovač s nasledujúcimi špecifikáciami: • Vyhrievané veko s možnosťou nastavenia na 30 °C a 100 °C (alebo s možnosťou vypnutia, ak nie je možné dosiahnuť teplotu 30 °C) • Zahŕňa teplotný rozsah 4 °C až 99 °C • Presnosť teploty $\pm 0,25$ °C • Kompatibilné s platničkami PCR s 96 jamkami, 0,2 ml • Pozrite si časť Rýchlosť nábehu termocykléra na strane 26	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Vortexový mixér	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Zariadenia	Dodávateľ
Inkubátory na mikrovzorky (2) s vložkami na platničky MIDI s 96 jamkami (2)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Mikroodstredivka	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Centrifúga na platničky s nasledujúcimi špecifikáciami: - Kompatibilné s 96-jamkovými platničkami - Možnosť otáčok 280 × g (+/- 10 %)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Trepačka platničiek s nasledujúcimi špecifikáciami: - Orbit 2 mm - Možnosť pretrepania s otáčkami 1 200 a 1 800 ot./min	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Tesniaci klin alebo valček	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Magnetický stojan s nasledujúcimi špecifikáciami: - Určený na precipitáciu/separáciu paramagnetických guľôčok - Magnety na bočnej strane stojana (nie v dolnej časti) - Kompatibilné s 96-jamkovými platničkami MIDI	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Presné pipety schopné presne dodávať objemy od 2 µl do 1 000 µl s nasledujúcimi špecifikáciami: - Jednokanálová alebo viackanálová pipeta s prírastkom 0,02 µl - Jednokanálová alebo viackanálová pipeta s prírastkom 0,1 µl, 0,2 µl alebo 0,5 µl - Jednokanálová alebo viackanálová pipeta s prírastkom 1 µl alebo 2 µl Pipety musia byť pravidelne a presne kalibrované do 5 % uvedeného objemu.	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pomôcka pre pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Ľadový alebo studený blok	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Sérologické pipety s objemom 10 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Zariadenia	Dodávateľ
Adhezívne plomby pre 96-jamkové platničky s nasledujúcimi špecifikáciami: • Odlupovateľné • Vhodné pre platničky PCR s obrubou alebo čiastočnou obrubou • Odolné adhezívum, ktoré vydrží viaceré zmeny teploty v rozsahu -20 °C až 100 °C • Bez obsahu DNázy/RNázy	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skúmavky do mikrodstredivky s objemom 1,7 ml, bez nukleázy	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Nádoby na reagenty bez nukleázy (jednorazová úzka vanička, 50 ml) (alebo ekvivalent)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 15 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 50 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kompatibilné pipetové špičky odolné voči aerosólu	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skladovacie platničky s 96 jamkami, 0,8 ml (platničky MIDI)	Fisher Scientific, č. položky AB-0859 alebo ekvivalent
Platničky PCR s 96 jamkami kompatibilné s termocyklérom, 0,2 ml (polypropylénové jamky)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Vybavenie a materiály po amplifikácii

Zariadenia	Dodávateľ
Prístroj NextSeq 550Dx	Illumina, katalógové číslo 20005715
Centrifúga na platničky s nasledujúcimi špecifikáciami: • Kompatibilné s 96-jamkovými platničkami • Možnosť otáčok 280 × g (+/- 10 %)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Teplný cyklovač s nasledujúcimi špecifikáciami: • Vyhrievané veko (100 °C) • Zahŕňa teplotný rozsah 4 °C až 99 °C • Presnosť teploty ±0,25 °C • Kompatibilné s platničkami PCR s 96 jamkami, 0,2 ml • Pozrite si časť Rýchlosť nábehu termocykléra na strane 26	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Zariadenia	Dodávateľ
Vortexový mixér	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Inkubátor na mikrovzorky s vložkou na platničky MIDI s 96 jamkami	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Suchý tepelný blok s nasledujúcimi špecifikáciami: • Teplotný rozsah 25 °C až 99 °C • Presnosť teploty ± 5 °C • Zabezpečte, aby skúmavky do mikroodstredivky boli kompatibilné s tepelným blokom	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Trepačka platničiek s nasledujúcimi špecifikáciami: • Orbit 2 mm • Možnosť pretrepania s otáčkami 1 200 a 1 800 ot./min	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Mikroodstredivka	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Tesniaci klin alebo valček	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Magnetický stojan s nasledujúcimi špecifikáciami: • Určený na precipitáciu/separáciu paramagnetických guľôčok • Magnety na bočnej strane stojana (nie v dolnej časti) • Kompatibilné s 96-jamkovými platničkami MIDI	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Presné pipety schopné presne dodávať objemy od 2 μ l do 1 000 μ l s nasledujúcimi špecifikáciami: • Jednokanálová alebo viackanálová pipeta s prírastkom 0,02 μl • Jednokanálová alebo viackanálová pipeta s prírastkom 0,1 μl, 0,2 μl alebo 0,5 μl • Jednokanálová alebo viackanálová pipeta s prírastkom 1 μl alebo 2 μl Pipety musia byť pravidelne a presne kalibrované do 5 % uvedeného objemu.	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pomôcka pre pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Sérologické pipety s objemom 10 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Zariadenia	Dodávateľ
Adhezívne plomby pre 96-jamkové platničky s nasledujúcimi špecifikáciami: • Odlupovateľné • Vhodné pre platničky PCR s obrubou alebo čiastočnou obrubou • Odolné adhezívum, ktoré vydrží viaceré zmeny teploty v rozsahu -20 °C až 100 °C • Bez obsahu DNázy/RNázy	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skúmavky do mikrodstredivky s objemom 2 ml, bez nukleázy	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skúmavky do mikrodstredivky s objemom 1,7 ml, bez nukleázy	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Nádoby na reagenty bez nukleázy (jednorazová úzka vanička, 50 ml) (alebo ekvivalent)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 15 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 50 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kompatibilné pipetové špičky odolné voči aerosólu	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skladovacie platničky s 96 jamkami, 0,8 ml (platničky MIDI)	Fisher Scientific, č. položky AB-0859 alebo ekvivalent
Platničky PCR s 96 jamkami kompatibilné s termocyklérom, 0,2 ml (polypropylénové jamky)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Ľadový alebo studený blok	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Nastavenia konfigurácie ultrazvukového prístroja na fragmentáciu DNA

Fragmentácia DNA, alebo štiepenie, ovplyvňuje účinnosť analýzy určením distribúcie veľkosti fragmentov, čo následne ovplyvňuje pokrytie sekvenovania. Bolo hodnotených niekoľko špecifických konfigurácií ultrazvukového spracovania a tieto konfigurácie boli optimalizované pre analýzu TSO Comprehensive (EU) ([Tabuľka 4](#)).

- Čas štiepenia bol upravený tak, aby bola maximalizovaná metrika MEDIAN_EXON_COVERAGE uvádzaná v časti [Kontrola kvality na strane 82](#). Časy štiepenia (uvedené v [Tabuľka 4](#)) a metriky MEDIAN_INSERT_SIZE sa v rámci jednotlivých konfigurácií odlišovali.

- Konfigurácie 1 – 4 a 6 sa testovali pomocou sklenených skúmaviek s 8 prúžkami. Konfigurácia 5 použila jednu sklenenú skúmavku. Objemové kapacity skúmaviek sú uvedené v [Tabuľka 4](#).
- Optimalizácia konfigurácií 3 – 6 (vodné kúpele s menšími objemami) použila pulzovanie.
- Konfigurácie 3 – 5 boli štiepené v skúmavkách s menšími objemami. Objemové kapacity skúmaviek ovplyvňujú parametre štiepenia.
- Konfigurácia 4 (líniová sonda, vodný kúpeľ so stredne veľkým objemom, voda zbavená plynov) vyžadovala dlhú dobu oneskorenia pulzovania (40 sekúnd) na dosiahnutie podobnej hodnoty MEDIAN_EXON_COVERAGE ako konfigurácia 1 a 2 pri nominálnom vstupe 40 ng.
- Optimálne nastavenia pre konfiguráciu 3 viedli k o niečo väčšej distribúcii veľkosti fragmentov v porovnaní s ostatnými konfiguráciami (hodnota MEDIAN_INSERT_SIZE bola približne o 5 – 10 párov báz väčšia).
- V konfiguráciách 3 a 5 sa použili neodplynená voda a najmenší objem vodného kúpeľa.
- Konfigurácie 3 a 5 potrebovali zvýšený vstup DNA (50 ng pre konfiguráciu 3, 60 ng pre konfiguráciu 5) na dosiahnutie podobnej hodnoty MEDIAN_EXON_COVERAGE v porovnaní s ostatnými 4 konfiguráciami, ktoré používali nominálny vstup 40 ng.
- Konfigurácie 3 a 5 vykazovali vyššiu mieru poškodenia a/alebo denaturácie, a preto mali znížený objem efektívnej hmoty použiteľných molekúl dsDNA na prípravu knižnice.

Počas procesu regenerácie odstred'te skúmavky na štiepenie, aby ste zaistili získanie stanoveného objemu, keďže akákoľvek strata materiálu môže nežiaducim spôsobom ovplyvniť účinnosť.

Tabuľka 4 Hodnotenie cielených konfigurácií ultrazvukového prístroja

Parameter	Konfigurácia					
	1	2	3	4	5	6
Sonda	Línia	Bod	Bod	Línia	Bod	Línia
Objem vodného kúpeľa	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Voda zbavená plynov	Áno	Áno	Nie	Áno	Nie	Áno
Vodný chladič	Áno	Áno	Áno	Áno	Áno	Áno
Teplota vodného kúpeľa	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Výkon pri incidente v peaku (výboji) (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% faktora využitia	30	10	30	25	20	25
Počet cyklov na výboj	200	200	1000	1000	1000	600
Pulzovanie (10-sekundové výboje)	Nie	Nie	Áno	Áno	Áno	Áno
Doba oneskorenia pulzovania	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	10 s	40 s	10 s	10 s
Čas štiepenia	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Spracovanie vzorky	1 – 8	1	1	1 – 8	1	1 – 8
Veľkosť dávky	1 – 96	1 – 96	1 – 8	1 – 8	1	1 – 96

Parameter	Konfigurácia					
	1	2	3	4	5	6
Veľkosť vzorky v sklenenej skúmavke s 8 prúžkami	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Jedna skúmavka (50 µl)	130 µl (alebo platnička pre 96 mikroskúmaviek)
Dithering	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	3 mm Y pri 20 mm/s	Nevzťahuje sa	1,5 mm Y pri 10 mm/s
Ekvivalent vstupu DNA (pre mediánové pokrytie exónu)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Čas štiepenia 200 s pozostáva z 10-sekundových výbojov a 20 opakovaní.

² Čas štiepenia 320 s pozostáva z 10-sekundových výbojov a 32 opakovaní.

Rýchlosť nábehu termocykléra

Rýchlosť nábehu termocykléra ovplyvňuje metriky kontroly kvality analýzy (použiteľné lokality MSI, mediánový binárny počet na cieľ CNV, mediánová veľkosť inzercie (RNA)), rovnako ako podporné čítania pre varianty zostrihu a fúzie. Je odporúčané vykonať optimalizáciu rýchlosti nábehu termocykléra. Napríklad: nastavenie testovaného modelu bolo upravené z predvolenej (a maximálnej) rýchlosti nábehu 5 °C/s na 3 °C/s na získanie výsledkov porovnateľných s inými modelmi s nižšími predvolenými rýchlosťami nábehu.

Odber, preprava a skladovanie vzoriek

Počas odberu, prepravy, skladovania a spracovania vzoriek postupujte podľa štandardných postupov.

Požiadavky na vzorky

Tkanivo FFPE

Analýza TSO Comprehensive (EU) vyžaduje 40 ng RNA a/alebo 40 ng DNA extrahovaných z tkaniva FFPE. Použitie RNA aj DNA umožňuje analyzovať všetky predpokladané typy variantu. Tkanivo by malo byť fixované pomocou formálnového fixatíva vhodného na molekulárnu analýzu (napríklad 10 % neutrálny pufrovaný formalín). Tkanivo nesmie byť dekalifikované. Pred vykonaním analýzy TSO Comprehensive (EU) je tkanivovú vzorku potrebné nechať preskúmať patológom a overiť, či je vzorka na daný test vhodná. Na detekciu niektorých mutácií somatického stimulačného faktora sa vyžaduje minimálny obsah tumoru 20 % (podľa oblasti). Spoľahlivá detekcia stavu MSI v rôznych vzorkách vyžaduje minimálne 30 % obsahu tumoru. Ak je vzorka testovaná s menej ako 30 % obsahom tumoru na určenie výsledkov s inými typmi variantov, výsledok MS-Stable môže byť nespoľahlivý. Výsledok MSI-High je správny bez ohľadu na obsah tumoru.

Obsah tumoru v prípade amplifikácií génov a variantov RNA závisí od rozsahu amplifikácie alebo expresie fúzie (pozrite si časť [Obsah tumoru na strane 106](#)).

Na vysokú pravdepodobnosť extrakcie 40 ng RNA a 40 ng DNA z rôznych typov solídnych tkanív je odporúčaný objem tkaniva $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Tento objem je ekvivalentný kumulatívnej ploche životaschopného tkaniva $\geq 200 \text{ mm}^2$ pri použití 5 μm hrubých sekcií alebo $\geq 100 \text{ mm}^2$ pri použití 10 μm hrubých sekcií. Kumulatívna plocha tkaniva predstavuje súčet plochy životaschopného tkaniva vo všetkých sekciách určených na extrakciu. Napríklad kumulatívnu plochu tkaniva 200 mm^2 možno získať extrakciou štyroch 5 μm sekcií s 50 mm^2 plochou tkaniva na každú sekciu, alebo piatich 10 μm sekcií s plochou tkaniva 20 mm^2 na každú sekciu. Nekróza tkaniva môže znižovať množstvo získanej nukleovej kyseliny. Na minimalizáciu pravdepodobnosti falošných negatívnych výsledkov môže byť tkanivo makrodisekované na dosiahnutie požadovaného obsahu životaschopných buniek tumoru.

Vysoké podiely nekrotického tkaniva ($\geq 23 \%$ plochy) môžu narúšať schopnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) detegovať amplifikácie génov a fúzie RNA. Ak sekcie vzorky obsahujú viac než 23 % nekrózy na celkovej ploche tkaniva, nekrotické tkanivo je potrebné makrodisekovať. Ak laboratórium spracováva RNA prostredníctvom analýzy, pri získavaní rezov z tkanivového bloku je potrebné vyhnúť sa tkanivu s hemoglobínom alebo ho minimalizovať. Pozrite si časť [Interferujúce látky na strane 97](#).

Tkanivo FFPE upevnené na sklíčku možno skladovať až 28 dní pri izbovej teplote.

Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny

- RNA a DNA extrahujte z tkanivových vzoriek FFPE pomocou komerčne dostupných extrakčných súprav. Rozdiely v extrakčných súpravách môžu ovplyvňovať účinnosť. Pozrite si časť [Hodnotenie súpravy na extrakciu nukleovej kyseliny na strane 95](#).
- Počas extrakcie zo štandardnej koncentrácie poskytnutej v extrakčnej súprave nezvyšujte proteínázu K ani ekvivalentný enzým. Pozrite si časť [Interferujúce látky na strane 97](#).
- Extrahovanú nukleovú kyselinu uskladňujte podľa pokynov od výrobcu extrakčnej súpravy.
- Extrahovanú DNA skladujte max. 28 dní pri teplote -25 °C až -15 °C.
- Extrahovanú RNA skladujte max. 28 dní pri teplote -85 °C až -65 °C.
- S cieľom vyhnúť sa zmenám koncentrácie v čase odmerajte DNA a RNA do 28 dní od začiatku prípravy knižnice. Kvantifikáciu RNA a DNA vykonajte pomocou metódy fluorometrickej kvantifikácie, ktorá využíva farbivá viažuce sa na nukleovú kyselinu. Koncentrácia nukleovej kyseliny by mala byť strednou hodnotou najmenej troch meraní.
- Analýza vyžaduje 40 ng každej vzorky RNA pripravenej v RNase/DNase-free water (nedodáva sa), pričom záverečný objem by mal byť 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Analýza vyžaduje 40 ng každej vzorky gDNA s minimálnou koncentráciou extrakcie 3,33 ng/µl. Štiepenie vyžaduje záverečný objem 52 µl (0,77 ng/µl) s minimálne 40 µl produktu TEB (dodáva sa) použitého ako riedidlo.

Uskladnenie knižníc

Knižnice skladujte na platničkách PCR s nízkou mierou viazania 7 až 32 dní, v závislosti od typu knižnice (pozrite si [Tabuľka 5](#)).

Tabuľka 5 Doba uskladnenie knižnice

Typ knižnice	Platnička	Počet dní	Teplota pri uskladnení
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
Fragmentovaná gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
Pred obohatením	ALS PCR	≤ 30	-25 °C až -15 °C
Po obohatení	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
PCR po obohatení	PL PCR	≤ 30	-25 °C až -15 °C
Normalizované	NL PCR	≤ 32	-25 °C až -15 °C

Varovania a preventívne opatrenia

Bezpečnosť



VAROVANIE

Táto súprava reagensíí obsahuje potenciálne nebezpečné chemikálie. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam. Pri manipulácii s nebezpečnými materiálmi v reagensiach by mala byť použitá vhodná ventilácia. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho pláštá, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, štátnymi a miestnymi zákonmi a predpismi. Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na karte bezpečnostných údajov na stránke support.illumina.com/sds.html.

- So všetkými vzorkami narábajte tak, ako keby boli infekčné.
- Použite bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a reagensiami na analýzy noste jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagensiami na analýzy si dôkladne umyte ruky.

Laboratórium

- Na zabránenie kontaminácii dbajte na dodržanie jednosmerného pracovného postupu v laboratóriu. Priestory pred amplifikáciou a po amplifikácii musia disponovať špecializovaným vybavením a materiálmi (napr. pipety, špičky pipiet, vortex a odstredivka). Na zabránenie prenosu amplifikovaného produktu alebo sondy sa po vstupe do oblasti po amplifikácii nevracajte naspäť do oblasti pred amplifikáciou.
- Vykonajte kroky indexácie PCR a obohatenia v oblasti po amplifikácii, aby nedošlo k prenosu produktu amplifikácie.
- Postupy prípravy knižnice vyžadujú prostredie bez obsahu RNázy/DNázy. Pomocou čistiaceho prostriedku na inhibíciu RNázy/DNázy dôkladne dekontaminujte pracovné oblasti. Používajte plastové materiály s certifikáciou bez obsahu DNázy, RNázy a ľudskej genomickej DNA.
- Pokiaľ ide o postupy po amplifikácii, pracovné povrchy a vybavenie dôkladne vyčistite pred každou procedúrou a po nej pomocou čerstvo pripraveného roztoku chlórnanu sodného (NaOCl) s koncentráciou 0,5 %. Nechajte roztok pôsobiť na povrchoch 10 minút a potom ho zotrite obrúskom navlhčeným v 70 % roztoku etylalkoholu alebo izopropylalkoholu.
- Používajte skúmavky, platničky, špičky pipiet a nádoby bez obsahu nukleázy.
- Počas analýzy používajte kalibrované vybavenie. Dbajte na to, aby ste kalibrovali vybavenie podľa rýchlostí, teplôt a objemov uvádzaných v tomto protokole.

- Na zaistenie správnosti dávkovania reagensí a vzoriek používajte presné pipety. Kalibráciu vykonávajte pravidelne podľa pokynov výrobcu.
- Počas používania multikanálových pipiet postupujte podľa nasledujúcich pokynov:
 - Objem pipetovania musí byť najmenej $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Overte, či špičky s bariérou „dobře sedia“ a či sú vhodné z hľadiska značky a modelu multikanálovej pipety.
 - Špičky pripevňujte otáčaním a dbajte na to, aby boli všetky riadne nasadené.
 - Aspiráciu vykonávajte pod uhlom 90° a dodržiavajte rovnaké hladiny objemu vo všetkých špičkách.
 - Po aplikácii premiešajte všetky komponenty pipetovaním reakčnej zmesi (nahor/nadol).
 - Po dokončení dávkovania skontrolujte, či bola kvapalina úplne nadávkovaná z každej špičky.
- Používajte vybavenie stanovené pre danú analýzu a programy nastavujte presne podľa pokynov.
- Stanovené teploty termocykléra a inkubátora na mikrovzorky indikujú teplotu reakcie, nemusia indikovať nastavenú teplotu zariadenia.

Analýza

- Dbajte na to, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii.
 - Keď manipulujete so vzorkami a reagensiami, postupujte podľa príslušných laboratórnych postupov.
 - Pri spracovaní jednotlivých vzoriek a pri dávkovaní nových reagensí používajte zakaždým nový laboratórny spotrebný materiál a nové pipetové špičky.
 - Na obmedzenie rizika krížovej kontaminácie používajte špičky odolné proti aerosólom.
 - Keď sa premiestňujete z oblasti pred amplifikáciou do oblasti po amplifikácii, používajte jednosmerný tok pracovných činností.
 - Naraz vždy otvárajte a manipulujte iba s jedným indexovacím primérom. Ihneď po použití uzavrite každú skúmavku s indexom viečkom. Súprava obsahuje ďalšie viečka.
 - Rukavice si meňte často a tiež, keď dôjde k ich kontaktu s indexovacími priméromi alebo vzorkami.
 - Nepoužité skúmavky s indexovacími priméromi odstráňte z pracovnej oblasti.
 - Nevracajte reagensie do skladovacích skúmaviek po ich použití v prúžku so skúmavkami, úzkej vaničke alebo zásobníku.
 - Vzorky premiešajte pipetou a podľa indikácie odstred'te platničku.
 - Používajte trepačku na mikroplatničky. Platničky nemiešajte vo vortexe.
- Dbajte na to, aby nedošlo k zámene komponentov analýzy z odlišných šarží súprav reagensí. Šarže súprav reagensí sú označené na štítku balenia súpravy reagensí a v informačnom hárku k šarži.
- Vyžaduje sa dodržiavanie správnych laboratórnych postupov, aby nedošlo ku kontaminácii reagensí, prístrojov, vzoriek a knižníc nukleázami a produktmi PCR. Kontaminácia spôsobená nukleázou a produktmi PCR môže zapríčiniť nepresné a nespoľahlivé výsledky.

- Na dosiahnutie optimálnej účinnosti analýzy a jej uchovávanie sa vyžaduje správny typ platničky. Dodržiavajte pokyny na prenos platničky, ktoré opisuje [Návod na použitie na strane 40](#).
- Nedodržovanie uvádzaných postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo významnému zníženiu kvality knižnice.
- Ak [Návod na použitie na strane 40](#) neuvádza bod bezpečného zastavenia, ihneď pokračujte ďalším krokom.
- Analytické reagencie alebo komponenty skladujte pri stanovenej teplote v určených predamplifikačných a poamplifikačných oblastiach.
- Reagencie neskladujte v beznámrazovej skladovacej jednotke ani vo dverách chladničky.
- Reagencie obsahujúce guľôčky (LNB1, SPB a SMB) nezmrazujte.
- Nepoužívajte nesprávne skladované reagencie.
- Presne dodržiavajte pokyny na miešanie a manipuláciu uvádzané pre každú reagenciu. Nedostatočné miešanie alebo nadmerné miešanie reagencií vo vortexe môže viesť k nesprávnym výsledkom vzoriek.
- FSM, SSM, ERA1-B a TCB1 môžu obsahovať častice súvisiace s produktom. Pri manipulácii s každou konkrétnou reagenciou dodržiavajte pokyny k manipulácii. Po vykonaní krokov premiešania FSM a SSM nebudú mať zostávajúce biele častice súvisiace s produktom vplyv na účinnosť.
- Pripravte si čerstvé hlavné zmesi a po použití zvyšný obsah zlikvidujte.
- Vždy si pripravte čerstvý 80 % roztok etanolu s RNase/DNase-free water (vodou bez obsahu RNázy/DNázy) na premývanie. Etanol dokáže absorbovať vodu zo vzduchu, čo môže ovplyvňovať výsledky. 80 % roztok etanolu po použití zlikvidujte v súlade s miestnymi, štátnymi alebo federálnymi nariadeniami.
- Prenášajte stanovený objem eluátu. Prenos menšieho než stanoveného objemu eluátu počas elúcie môže ovplyvňovať výsledky.
- Postupujte podľa nasledujúcich pokynov týkajúcich sa ultrazvukových prístrojov. Dodržiavajte pokyny výrobcu.
 - gDNA napíňajte do skúmavky určenej do ultrazvukového prístroja pomaly, aby nedochádzalo k tvorbe bublín. Nadmerné množstvo bublín alebo vzduchová medzera v skúmavke na štiepenie môžu viesť k neúplnej fragmentácii.
 - Dávkovanie do skúmaviek ultrazvukového prístroja vykonávajte pomaly a dbajte na to, aby nedochádzalo k rozstreknutiu.
 - S cieľom vyhnúť sa vytlačeniu kvapaliny a strate vzorky nezasúvajte špičku pipety počas odoberania fragmentovanej DNA do spodnej časti skúmavky určenej do ultrazvukového prístroja.
- Nepipetujte menej než 2 µl vstupu vzorky.
- Nepoužívajte úzku vaničku na dávkovanie reagencií v krokoch, ktoré vyžadujú pridanie menej než 10 µl materiálu do každej jamky na vzorku.
- Počas prenosu vzoriek fragmentovanej gDNA zo skúmaviek ultrazvukového prístroja na platničku prípravy knižnice (LP) používajte pipetu s jemnou špičkou.
- Nekombinujte spolu adaptéry UMI a SUA1.

- Adaptéry SUA1 použite v prípade vzoriek RNA.
- Adaptéry UMI použite v prípade vzoriek DNA.
- Priradte odlišné indexovacie priméry ku každej vzorke knižnice na jedinečnú identifikáciu každej knižnice v prípade jej združovania na sekvenovanie v jednom prietokovom článku.
- Nekombinujte v rovnakej knižnici indexovacie priméry CPxx a UPxx.
- Nezhoda medzi vzorkami a indexovacími primérmi spôsobí vykazovanie nesprávnych výsledkov v dôsledku toho, že nedôjde k pozitívnej identifikácii vzorky. Než začnete s prípravou knižnice, zadajte ID vzoriek a priradte indexy v aplikácii Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Počas prípravy knižnice si zaznamenajte ID vzoriek, indexovanie a orientáciu jamiek platničky.
- V prípade knižníc získaných zo vzoriek RNA používajte iba indexy UPxx.
- V prípade knižníc získaných zo vzoriek DNA používajte indexy UPxx alebo CPxx.
- Sekvenujte maximálne 8 knižníc RNA a 8 knižníc DNA na jeden prietokový článok. Sekvenujte minimálne tri knižnice. Postupujte podľa pokynov v časti [Počet knižníc a výber indexov na strane 36](#).
- Po dokončení kroku viazania v častiach [Prvé zachytenie cieľov na strane 61](#) a [Druhé zachytenie cieľov na strane 65](#) pokračujte ihneď krokom premývania na zabránenie vysušeniu guľôčkových peliet.
- Počas krokov premývania odstráňte všetok 80 % roztok etanolu zo spodnej časti jamiek. Preukázalo sa, že zvyškový etanol má vplyv na výsledky.
- Na dosiahnutie optimálnej účinnosti analýzy dodržiavajte počet premytí uvádzaný v dokumente [Návod na použitie na strane 40](#).
- Počas procedúry [Normalizácia knižníc na strane 72](#) dôkladne resuspendujte guľôčkovú peletu knižnice na dosiahnutie konzistentnej hustoty klastra na prietokovom článku.
- Ihneď nahláste akékoľvek závažné udalosti spojené s týmto výrobkom spoločnosti Illumina a príslušným úradom v členskom štáte, v ktorom sa nachádzajú používateľ aj pacient.

Poznámky k procedúre

- Pracovný postup analýzy TSO Comprehensive (EU) je možné realizovať podľa nasledujúceho harmonogramu:
 - Deň 1: syntéza cDNA zo vzoriek RNA, DNA fragmentácia vzoriek gDNA, príprava knižnice a spustenie nočnej (prvej) hybridizácie.
 - Deň 2: Obohatenie, normalizácia obohatených knižníc a vkladanie knižníc do prístroja Prístroj NextSeq 550Dx.Ak nie je možné realizovať pracovný postup analýzy TSO Comprehensive (EU) podľa tohto harmonogramu, v rámci protokolu je stanovených niekoľko bodov bezpečného zastavenia. Ak sa v protokole neurčí bod bezpečného zastavenia, ihneď prejdite na ďalší krok.
- Knižnice získané zo vzoriek RNA a DNA je možné pripraviť súbežne v osobitných jamkách.

- Tabuľky s prípravou hlavnej zmesi zahŕňajú objemový prebytok na zaistenie dostatočného množstva vzhľadom na počet spracúvaných vzoriek.
- Používajte vodu triedy určenej pre molekulárnu biológiu bez obsahu nukleáz.
- Po pridaní reagentie vypláchnite špičku jednorazovou aspiráciou a nadávkovaním do príslušnej jamky na platničke (ak nie je stanovené v procedúre inak).
- Izbová teplota je stanovená na 15 °C až 30 °C.
- Činidlá, vzorky a knižnice musia byť v určitých krokoch v návode na použitie uchované v chlade. Je to definované ako uchovávanie na ľade alebo ekvivalente.

Programy termocykléra

- Pred spustením protokolu naprogramujte programy termocykléra na predamplifikačné a postamplifikačné vybavenie.
- Overte, či platničky PCR v termocykléri riadne „sedia“.
- Používajte platničky odporúčané výrobcom termocykléra.

Utesnenie a odkrytie platničky

- Platničky vždy utesňujte novým adhezívnym tesniacim pokrytím. Tesnenia opakovane nepoužívajte.
- Ak chcete utesniť platničku, pomocou tesniaceho klína alebo valčeka riadne umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku.
- Platničku s 96 jamkami pred vykonaním ďalších krokov protokolu vždy utesnite novým adhezívnym tesniacim pokrytím.
 - Kroky pretrepania platničky
 - Kroky odstred'ovania
 - Kroky termocyklovania
 - Hybridizácie
 - Dlhodobé skladovanie
- Na obmedzenie rizika krížovej kontaminácie a odparovania overte, či sú okraje a jamky utesnené.
- Než začnete pomaly odstraňovať tesnenie, položte platničku na rovný povrch.
- Ak pred jej odkrytím spozorujete kvapalinu alebo kondenzáciu na tesnení alebo bočných stenách jamiek platničky, vykonajte odstredenie s otáčkami 280 × g po dobu 1 minúty.
- Používajte adhezívne tesniace pokrytia, ktoré si zachovávajú funkčnosť pri teplotách -20 °C až 100 °C a sú vhodné pre platničky s obrubou alebo polovičnou obrubou.

Zariadenia

- Dbajte na to, aby laboratórny personál poznal pokyny výrobcu na používanie a údržbu všetkého vybavenia pred spustením analýzy.

Typ platničky a prenosy platničky

- Na dosiahnutie optimálnej účinnosti analýzy a jej uchovávanie sa vyžaduje správny typ platničky.
- Keď prenášate objemy medzi platničkami, stanovený objem preneste z každej jamky platničky do príslušnej jamky na cieľovej platničke.
- Počas prenosov vzoriek medzi súpravami skúmaviek alebo platničkami je možné použiť multikanálové pipety.
- Počas pretrepávania platničiek postupujte podľa nasledujúcich pokynov.
 - Na pretrepanie platničky použite trepačku na platničky. Platničky nemiešajte vo vortexe.
 - Platničky PCR pretrepávajte s otáčkami 1 200 ot./min.
 - Platničky MIDI pretrepávajte s otáčkami 1800 ot./min.
 - Podľa pokynov od výrobcu zaistite, aby trepačka na platničky riadne „držala“ platničku.

Odstred'ovanie

- Keď pokyny v protokole indikujú krátke odstred'ovanie, odstred'ujte pri otáčkach $280 \times g$ po dobu 1 minúty.
- Ak na tesnení alebo na stranách jamiek spozorujete kvapalinu, odstred'ujte platničku pri otáčkach $280 \times g$ po dobu 1 minúty.

Manipulácia s reagensiami

- Všetky skúmavky s reagensiami po použití riadne uzavrite, aby ste obmedzili odparovanie a zabránili kontaminácii.
- Keď reagentie nebudete viac v rámci procedúry potrebovať, vráťte ich na miesto uskladnenia so stanovenou teplotou.
- Postupujte podľa pokynov na prípravu reagentií, ktoré sú uvedené pred každou procedurálnou časťou [Návod na použitie na strane 40](#).
- Pripravte si požadovaný objem hlavnej zmesi, elučnej zmesi a 80 % etanolu vzhľadom na počet spracúvaných vzoriek.
- Objemy uvádzané v tabuľkách hlavnej zmesi a roztokov obsahujú prebytok. Výpočty prebytku sú nasledovné.
 - [Tabuľka 14](#)
 - Objem FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{počet vzoriek} + \text{kontrol}) \times (1,25)$.
 - Objem RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{počet vzoriek} + \text{kontrol}) \times (1,25)$.

- **Tabuľka 21**
 - Objem ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,20)$.
 - Objem ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,20)$.
- **Tabuľka 29**
 - Objem EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,364)$.
 - Objem HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,364)$.
- **Tabuľka 30**
 - Objem EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,364)$.
 - Objem HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,364)$.
- **Tabuľka 36**
 - Objem LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (2,0)$.
 - Objem LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (2,0)$.
- **Tabuľka 37**
 - Objem EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,25)$.
 - Objem HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,25)$.

Súpravy adaptérov

- Analýza TSO Comprehensive (EU) obsahuje adaptéry SUA1 a UMI.
- Adaptéry SUA1 slúžia na použitie so vzorkami RNA. Nie sú určené na použitie so vzorkami DNA.
- Adaptéry UMI slúžia na použitie so vzorkami DNA. Nie sú určené na použitie so vzorkami RNA.

Manipulácia s guľôčkami

- Analýza TSO Comprehensive (EU) obsahuje tri typy guľôčok (SPB, SMB a LNB1). Dbajte na to, aby ste počas procedúry použili správny typ guľôčok.
- Vykonajte správny počet premytí pri každom type guľôčok.
- Dbajte na to, aby guľôčky pred použitím nadobudli izbovú teplotu.
- Na zaistenie homogenity miešajte guľôčky 1 minútu pred použitím.

- Keď miešate guľôčky pomocou pipety, postupujte podľa nasledujúcich pokynov:
 - Používajte vhodnú pipetu a veľkosť špičky vzhľadom na objem, ktorý miešate.
 - Upravte nastavenie objemu na približne 50 – 75 % objemu vzorky.
 - Pipetujte pomaly bez uvoľnenia piesta.
 - Dbajte na to, aby nedošlo k rozstreknutiu a vytvoreniu bubliniek.
 - Nastavte špičku pipety nad peletu a dávajte priamo do pelety, aby sa guľôčky uvoľnili z jamky alebo skúmavky.
 - Dbajte na to, aby sa guľôčková peleta nachádzala úplne celá v roztoku. Roztok by mal mať tmavohnedú farbu a homogénnu konzistenciu.
 - Overte, či je guľôčková peleta prítomná. Opatrne aspirujte celý roztok guľôčok v jamke do špičky a skontrolujte spodnú časť jamiek.
- Ak aspirujete guľôčky do špičiek pipety počas krokov magnetickej separácie, nadávajte guľôčky naspäť do jamky na platničke na magnetickom stojane. Počkajte, kým nebude kvapalina číra (približne 2 minúty) a potom pokračujte ďalším krokom procedúry.
- Keď premývate guľôčky:
 - Používajte odporúčaný magnetický stojan na platničku.
 - Kvapalinu dávajte priamo na guľôčkovú peletu tak, aby boli guľôčky na bočnej strane jamiek vlhké.
 - Ponechajte platničku na magnetickom stojane dovtedy, kým krok procedúry neuvádza, že ju máte odobrať.
 - Platničkou na magnetickom stojane netraste.
 - Kým je platnička na magnetickom stojane, nenarúšajte guľôčkovú peletu.
- Keď premývate guľôčky alebo odstraňujete supernatant, nakloňte špičky pipety v dolnej časti jamiek tak, aby ste nevytvárali podtlak a nenasali roztok do filtrov v pipetovej špičke.

Počet knižníc a výber indexov

Pred nastavením chodu naplánujte počet knižníc so vzorkami a počet indexov vzoriek pre chod sekvenovania. Nasledujúce pokyny týkajúce sa počtu vzoriek zahŕňajú pozitívne kontroly, nie však negatívne kontroly ani kontroly bez templátu (NTC). Kontroly NTC je potrebné pridať do naplánovaného chodu ako ďalšiu vzorku.

V prípade analýzy TSO Comprehensive (EU) postupujte podľa pokynov v [Tabuľka 6](#) a [Tabuľka 7](#) na stanovenie počtu knižníc RNA a/alebo DNA na sekvenovanie v jednom prietokovom článku. Ak sekvenujete knižnice RNA alebo DNA samostatne, pozrite si [Tabuľka 6](#). Ak sekvenujete knižnice RNA a DNA na rovnakom prietokovom článku, pozrite si [Tabuľka 7](#).

Tabuľka 6 Sekvenovanie knižníc RNA *alebo* knižníc DNA

Typ knižnice	Minimum*	Maximum*
Len RNA	3	16
Len DNA	3	8

* NTC neprispievajú k zložitosti.

Tabuľka 7 Sekvenovanie knižníc RNA a DNA na rovnakom prietokovom článku

Typ knižnice	Minimum*	Maximum*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC neprispievajú k zložitosti.

Na optimálne použitie reagensí pri sekvenovaní knižníc DNA a RNA pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) na prístroji Prístroj NextSeq 550Dx sekvenujte 8 knižníc RNA a 8 knižníc DNA na prietokový článok.

Indexovacie priméry jedinečne identifikujú každú vzorku a knižnice bude možné združiť na účely sekvenovania na jednom prietokovom článku. Kompatibilné kombinácie indexov sa zobrazia na obrazovke Create Run (Vytvorenie chodu) počas nastavovania chodu v softvéri Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Počas prípravy knižnice pridajte do každej knižnice vzoriek indexovací primér. *V každej knižnici vzoriek použite odlišnú zmes indexovacieho priméru.*

Dbajte na to, aby sa indexovacie priméry, ktoré používate so vzorkami, zhodovali s indexmi, ktoré vyberiete na analýzu pomocou softvéru Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU).

Nezhody môžu spôsobiť vykazovanie nesprávneho výsledku v dôsledku toho, že nedôjde k pozitívnej identifikácii vzorky.

V analýze TSO Comprehensive (EU) sú dva typy indexov.

- **Indexy UPxx** – indexy UPxx sa používajú pre knižnice získané zo vzoriek RNA alebo DNA.
- **Indexy CPxx** – indexy CPxx sa používajú pre knižnice získané zo vzoriek DNA. Nepoužívajte indexy CPxx v prípade knižníc získaných z RNA alebo vtedy, keď sekvenujete celkove iba tri knižnice DNA.

Keď sekvenujete iba tri knižnice, platia nasledujúce požiadavky:

- Knižnice musia byť všetky buď typu DNA, alebo RNA.
- Nepoužívajte súbory indexov CPxx.
- Na zabezpečenie požadovanej diverzity sa vyžaduje niektorá z nasledujúcich súprav indexov:
 - UP01, UP02 a UP03
 - UP04, UP05 a UP06
 - UP07, UP08 a UP09
 - UP10, UP11 a UP12

Prvej knižnici je napríklad priradená hodnota UP01, druhej knižnici UP02 a tretej knižnici UP03.

TruSight Oncology Kontroly

TSO Comprehensive (EU) vyžaduje Kontroly TruSight Oncology, ktoré pozostávajú z kontroly DNA TruSight Oncology a kontroly RNA TruSight Oncology ako pozitívne kontroly. Zahrňte kontrolu DNA TruSight Oncology do každého chodu sekvenovania DNA a kontrolu RNA TruSight Oncology do každého chodu sekvenovania RNA v rámci udalosti prípravy danej knižnice (zahrňte aj kontroly pre kombinované chody DNA a RNA). Ku každému plánovanému chodu sekvenovania je pripravená jedinečná pozitívna kontrola. Ďalšie informácie nájdete v dokumente Príbalový leták ku kontrolným vzorkám testu TruSight Oncology (200009919).

Vstupné množstvo pozitívnej kontroly je 40 ng pre DNA a RNA.

Zahrňte vhodnú kontrolu NTC (kontrola bez templátu) do každej udalosti prípravy knižnice RNA a DNA. Kontrola NTC sa opakovane sekvenuje v rámci jednej udalosti prípravy knižnice. Postupujte podľa týchto pokynov pre Kontroly TruSight Oncology:

- Pripravte si knižnice z pozitívnych kontrol a kontrol bez templátu identicky ako vzorky.
- Použite TEB pre kontrolu NTC DNA.
- Použite vodu bez obsahu DNázy/RNázy pre kontrolu NTC RNA.
- Pozitívne kontroly sú zahrnuté do maximálnej požiadavky na knižnicu.
- Kontroly NTC nie sú zahrnuté do minimálnej požiadavky na knižnicu.
- Počas sekvenovania len 3 knižníc použite indexy typu UP pre kontrolu NTC.
- Keďže kontrola NTC sa sekvenuje opakovane, indexy vybrané pre túto kontrolu nie je možné opakovať v udalosti prípravy knižnice.

Nasledujúce tabuľky uvádzajú vzorové rozloženia platničiek na prípravu knižnice. Každý očíslovaný stĺpec predstavuje jeden chod sekvenovania. V prípade spoločného sekvenovania knižníc DNA a RNA predstavuje každá príslušná skupina stĺpcov jeden chod sekvenovania (napríklad stĺpce 1 a 7). Kontrola NTC je sekvenovaná pre každý stĺpec alebo skupinu stĺpcov.

Tabuľka 8 Udalosť prípravy knižnice jedného chodu vrátane šiestich vzoriek pacienta

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pozitívna kontrola DNA	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	Pozitívna kontrola RNA
B	DNA 1	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 1
C	DNA 2	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 2
D	DNA 3	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 3
E	DNA 4	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 4
F	DNA 5	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 5
G	DNA 6	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 6
H	DNA NTC	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA NTC

Tabuľka 9 Udalosť prípravy knižnice pozostávajúca z troch chodov vrátane 20 vzoriek pacienta

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

Návod na použitie

Prehľad pracovného postupu analýzy TSO Comprehensive (EU) je zobrazený na [Obrázok 1](#) a [Obrázok 2](#).

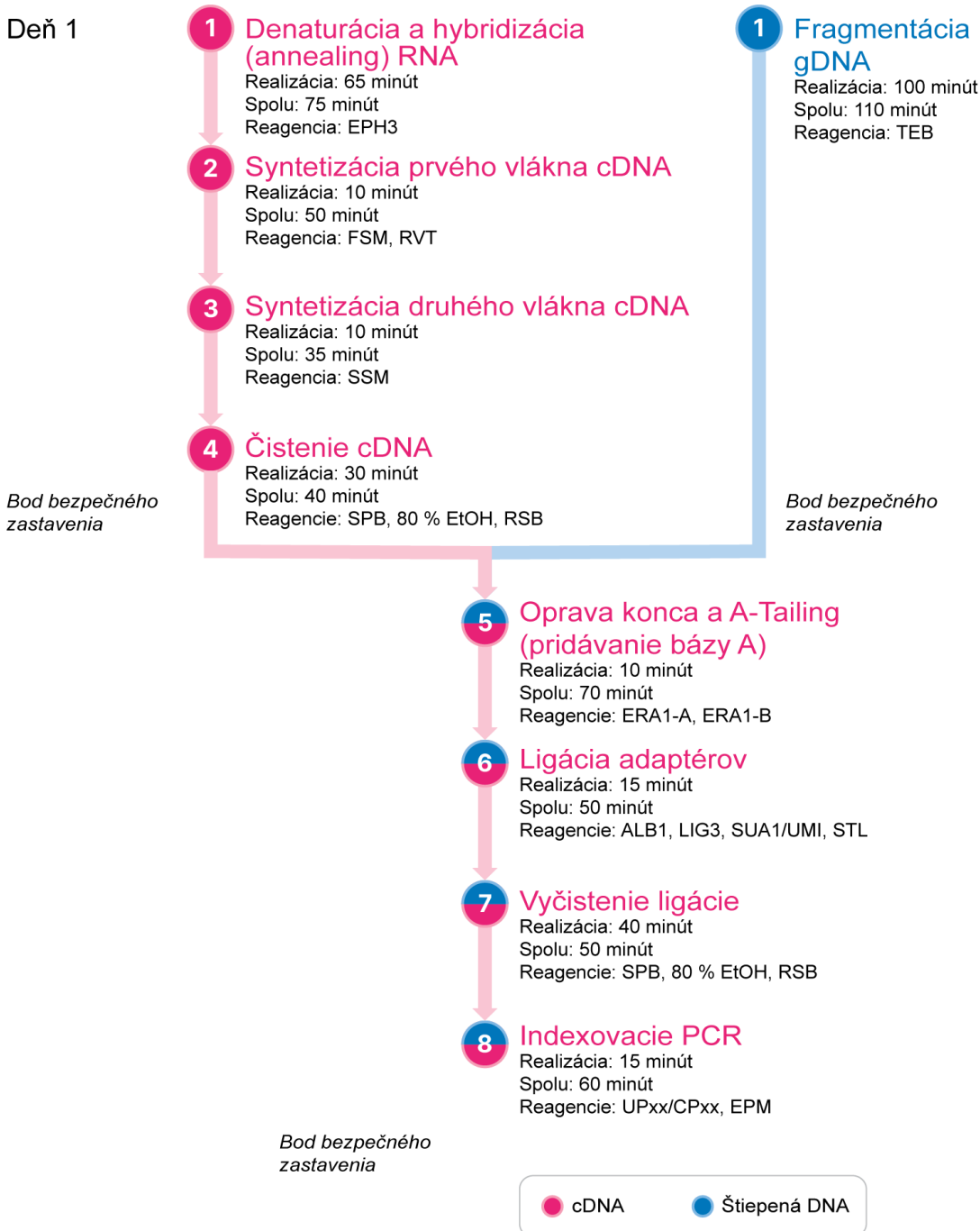
Pracovný postup prípravy knižnice

[Obrázok 1](#) uvádza pracovný postup prípravy knižnice na analýzu TSO Comprehensive (EU). Knižnice zo vzoriek RNA a DNA je možné pripraviť súbežne v osobitných jamkách. Pozitívne kontroly a kontroly bez templátu sú spracované identicky ako vzorky. Medzi jednotlivými krokmi sú vyznačené body bezpečného zastavenia.

Pred spustením protokolu zadajte do Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) informácie o chode a vzorkách. Pozrite si dokument *Príručka k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661).

Obrázok 1 Pracovný postup analýzy TSO Comprehensive (EU) (1. časť)

Deň 1

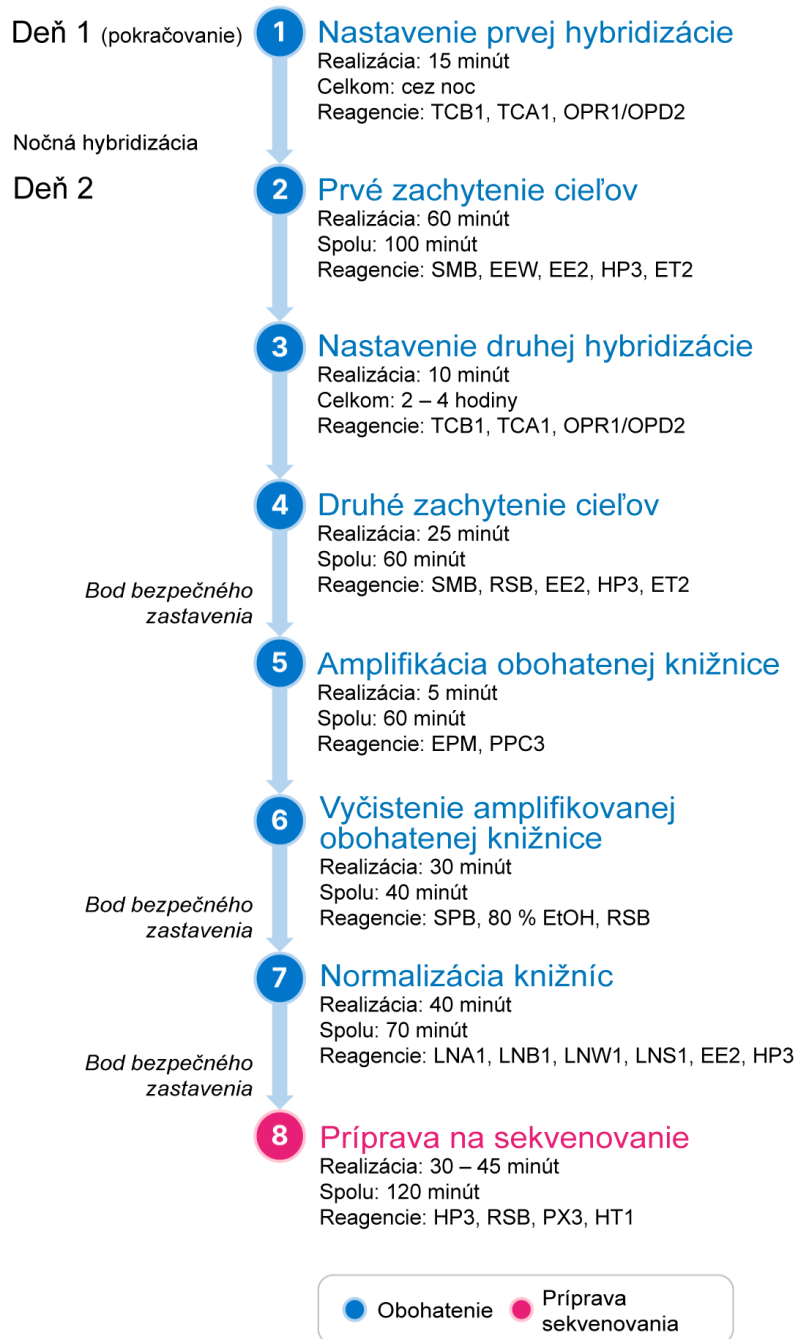


* Čas realizácie a celkový čas sú približné.

Pracovný postup obohatenia

Obrázok 2 uvádza pracovný postup obohatenia pre analýzu TSO Comprehensive (EU). Medzi jednotlivými krokmi sú vyznačené body bezpečného zastavenia.

Obrázok 2 Pracovný postup analýzy TSO Comprehensive (EU) (2. časť)



Programovanie termocykléra

Než začnete s analýzou, uložte nasledujúce programy v predamplifikačných a postamplifikačných termocykléroch.

Tabuľka 10 Programy predamplifikačného termocykléra

Krok procedúry	Názov programu	Teplota veka	Reakčný objem	Parametre termocykléra
Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	• 65 °C na 5 minút • 4 °C na 1 minút • Uchovávať pri teplote 4 °C
Syntetizácia prvého vlákna cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	• 25 °C na 10 minút • 42 °C na 15 minút • 70 °C na 15 minút • 4 °C na 1 minút • Uchovávať pri teplote 4 °C
Syntetizácia druhého vlákna cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	• 16 °C na 25 minút • 4 °C na 1 minút • Uchovávať pri teplote 4 °C

POZNÁMKA Ak nie je možné nastaviť teplotu veka pri kroku 2ndSS na 30 °C, vypnite možnosť predohriatia veka.

Tabuľka 11 Programy postamplifikačného termocykléra

Krok procedúry	Názov programu	Teplota veka	Reakčný objem	Parametre termocykléra
Indexovacie PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 98 °C na 30 sekúnd • 15 cyklov: • 98 °C na 10 sekúnd • 60 °C na 30 sekúnd • 72 °C na 30 sekúnd • 72 °C na 5 minút • Uchovávať pri teplote 10 °C
Vykonanie prvej hybridizácie	HYB1	100 °C	50 µl	• 95 °C na 10 minút • 85 °C na 2 min. 30 sekúnd • 75 °C na 2 min. 30 sekúnd • 65 °C na 2 min. 30 sekúnd • Uchovávať pri 57 °C na 8 až 24 hodín

Krok procedúry	Názov programu	Teplota veka	Reakčný objem	Parametre termocykléra
Vykonanie druhej hybridizácie	HYB2	100 °C	50 µl	95 °C na 10 minút 85 °C na 2 min. 30 sekúnd 75 °C na 2 min. 30 sekúnd 65 °C na 2 min. 30 sekúnd - Uchovávať pri 57 °C na 1,5 až 4 hodiny
Amplifikácia obohatenej knižnice	EL-PCR	100 °C	50 µl	98 °C na 30 sekúnd 18 cyklov: 98 °C na 10 sekúnd 60 °C na 30 sekúnd 72 °C na 30 sekúnd 72 °C na 5 min - Uchovávať pri teplote 10 °C

Príprava na protokol

Táto príprava je potrebná na vykonanie krokov protokolu vedúcich k ďalšiemu bezpečnému bodu zastavenia.



UPOZORNENIE

Všetky procedúry v rámci pracovného postupu vyžadujú použitie prostredia bez obsahu RNázy/DNázy.

1. Pomocou čistiaceho prostriedku na inhibíciu RNázy/DNázy dôkladne dekontaminujte pracovné oblasti.
2. Overte, či sú nastavené programy termocykléra pred amplifikáciou. Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).
3. Pri nastavovaní ultrazvukového prístroja postupujte podľa pokynov výrobcu.
4. Ak spracúvate iba vzorky DNA, pokračujte priamo časťou [Fragmentácia gDNA na strane 50](#).
5. Vyberte kontroly RNA z miesta uskladnenia.
6. Vytiahnite skúmavky s reagensiami z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 12 Súprava TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (č. položky 20031127)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
EPH3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA
FSM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Syntetizácia prvého vlákna cDNA
RVT	-25 °C až -15 °C	Uchovávať v chlade.	Syntetizácia prvého vlákna cDNA

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SSM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Syntetizácia druhého vlákna cDNA

Tabuľka 13 Súprava TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (č. položky 20031119)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SPB (svetlozelený štítok)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Čistenie cDNA
RSB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Čistenie cDNA

Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA

Tento proces denaturuje purifikovanú RNA a počas prípravy na syntézu cDNA do nej vkladá náhodné hexamérové priméry.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - EPH3 – odložte ju nabok.
 - FSM – premiešajte vo vortexe. Krátko odstred'te a pipetovaním premiešajte. Reagencia môže obsahovať biele častice súvisiace s produktom. Nevyžaduje sa žiadna akcia používateľa. Nemá to vplyv na účinnosť produktu.
 - RVT – krátko odstred'te a pipetovaním premiešajte. Uchovávajú v chlade.

POZNÁMKA RVT je viskózný roztok. Počas pipetovania sa snažte minimalizovať tvorbu bublín.

2. Do skúmavky do mikroadstredivky prenesť nasledujúce objemy na vytvorenie zmesi FSM + RVT Master mix.

Tabuľka 14 Zmes FSM + RVT Master Mix*

Komponent Master Mix	4 knižnice (µl)	8 knižníc (µl)	16 knižníc (µl)	24 knižníc (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagentami na strane 34](#).

3. Pipetovaním 10-krát premiešajte.
4. Zmes FSM + RVT Master Mix uchovajte v chlade až do kroku [Syntetizácia prvého vlákna cDNA na strane 46](#).

Postup

1. Extrahované vzorky RNA a kontroly RNA uchovávajte počas rozmrazovania v chlade. Kontroly RNA spracujte ako vzorky v rámci zvyšnej časti protokolu.
2. Ak RNA nepoužívate, uchovávajte ju v chlade. Informácie o kvantifikácii vzoriek nájdete v časti [Požiadavky na vzorky na strane 27](#).
3. Pipetovaním 10-krát premiešajte každú vzorku RNA.
4. Použite produkt RNase/DNase-free water na prípravu 40 ng každej vzorky RNA s celkovým objemom 8,5 µl (4,7 ng/µl).
V prípade kontrol RNA použite koncentráciu uvedenú na označení skúmavky.
5. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako CF (fragmenty cDNA).
6. Pridajte 8,5 µl každej vzorky RNA do jedinečnej jamky na platničke CF PCR.
7. Počas nastavovania chodu dbajte na to, aby sa rozloženie platničky so vzorkami a indexy pre každú vzorku zhodovali s chodom naplánovaným v Analytický modul TSO Comprehensive (EU).
8. Premiešajte EPH3 vo vortexe a výsledný produkt krátko odstred'te.
9. Do každej jamky na vzorku pridajte 8,5 µl EPH3.
10. Na platničku CF PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.



UPOZORNENIE

Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.

11. Pretrepávajte 1 minútu pri otáčkach 1 200 ot./min.
12. Odstred'ujte pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty.
13. Vložte do termocykléra a spustite program LQ-RNA.
Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).
14. Keď vzorky dosiahnu teplotu 4 °C, počkajte 1 minútu. Ihneď pokračujte ďalším krokom.

Syntetizácia prvého vlákna cDNA

Tento proces vedie k reverznej transkripcii fragmentov RNA s vloženými náhodnými hexamérovými primérmí do prvého vlákna cDNA použitím produktu reverse transcriptase.

Postup

1. Vyberte platničku CF PCR z termocykléra.
2. Pipetovaním 10-krát premiešajte zmes FSM + RVT Master Mix. Zaistite, aby bola zmes FSM + RVT úplne homogénna.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 8 µl zmesi FSM + RVT Master Mix.
4. Pipetovaním 10-krát premiešajte.
5. Zvyšnú zmes FSM + RVT Master Mix zlikvidujte.

6. Na platničku CF PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
7. Pretrepávajte pri otáčkach 1 200 ot./min po dobu 1 minúty.
8. Odstred'ujte pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty.
9. Vložte do termocykléra a spustite program 1stSS.
Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).
10. Keď vzorky dosiahnu 4 °C, ihneď pokračujte ďalším krokom.
Vzorky prvého vlákna je možné ponechať pri teplote 4 °C max. 5 minút.

Syntetizácia druhého vlákna cDNA

Tento proces odstraňuje templát RNA a syntetizuje dvojvláknovú cDNA.

Príprava

1. Príprava SSM:
 - a. Preklopením 10-krát premiešajte.
 - b. Krátko odstred'ite. Reagencia môže obsahovať biele častice súvisiace s produktom. Nevyžaduje sa žiadna akcia. Nemá to vplyv na účinnosť produktu.

Postup

1. Vyberte platničku CF PCR z termocykléra.
2. Do každej jamky na vzorku pridajte 25 µl SSM.
3. Na platničku CF PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
4. Pretrepávajte pri otáčkach 1 200 ot./min po dobu 1 minúty.
5. Odstred'ujte pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty.
6. Vložte do termocykléra a spustite program 2ndSS.
Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).
7. Keď vzorky dosiahnu 4 °C, počkajte 1 minútu a potom ihneď pokračujte ďalším krokom.

Čistenie cDNA

V tomto postupe sa používa SPB na čistenie cDNA od nežiaducich komponentov reakcie. Gulôčky sa premývajú dvakrát pomocou čerstvo pripraveného 80 % EtOH. Použitím RSB sa vykoná elúcia cDNA.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.

- SPB – dbajte na to, aby sa guľôčky nachádzali 30 minút v prostredí s izbovou teplotou.
 - RSB – uložte na použitie v postupe.
2. Do 15 ml alebo 50 ml kónickej skúmavky si nasledovne pripravte čerstvý 80 % EtOH.

Tabuľka 15 Príprava čerstvého 80 % EtOH

Reagencia	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc
100 % EtOH, pure	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Čerstvý 80 % EtOH premiešajte vo vortexe.
4. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako BIND1 (viazanie cDNA).
5. Zakryte a odložte nabok.
6. Pripravte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vyberte platničku CF PCR z termocykléra.
2. Premiešajte SPB vo vortexe 1 minútu, aby sa guľôčky resuspendovali.
3. Ihneď pridajte 90 µl SPB do každej jamky na vzorku platničky BIND1 MIDI.
Ak na dávkovanie SPB používate úzku vaničku, zahrňte faktor prebytku 1,15 v prípade, že vytvárate postačujúce alikvoty materiálu na vzorku. Po pridaní SPB do každej jamky na vzorku zlikvidujte všetok zvyšný materiál.
4. Preneste celý objem (50 µl) každej vzorky z platničky CF PCR do príslušnej jamky platničky BIND1 MIDI.
5. Prázdnu platničku CF PCR zlikvidujte.
6. Na platničku BIND1 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
7. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
8. Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
9. Vložte platničku BIND1 MIDI do magnetického stojana na 5 minút.
10. Platničku nechajte na magnetickom stojane. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky na vzorku.

Premývanie

1. Guľôčky premyte podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Platničku BIND1 MIDI ponechajte na magnetickom stojane a do každej jamky na vzorku pridajte 200 µl čerstvo pripraveného 80 % EtOH.
 - b. Počkajte 30 sekúnd.

- c. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky na vzorku.
2. Guľôčky **druhý** raz premyte.
3. Na odstránenie zvyškového EtOH z každej jamky použite pipetu s jemnými špičkami.
4. Nepoužitý 80 % EtOH zlikvidujte.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku BIND1 MIDI z magnetického stojana.
2. RSB preklopte alebo premiešajte vo vortexe.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 22 µl RSB.
4. Na platničku BIND1 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
6. Inkubujte 2 minúty pri izbovej teplote.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako PCF (fragmenty purifikovanej cDNA).
Ak zastavenie vykonáte v [BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA na strane 49](#), použite platničku PCR.
9. Preneste 20 µl eluátu z každej jamky so vzorkou z platničky BIND1 MIDI do príslušnej jamky na platničke PCF.
10. Prázdnu platničku BIND1 MIDI zlikvidujte.
11. Pridajte 30 µl RSB do každej jamky so vzorkou na platničke PCF.
12. Pipetovaním 10-krát premiešajte.
13. Na platničku PCF umiestnite adhezívne tesniace pokrytie a uchovajte ju v chlade.
14. Produkty EPH3, FSM, RVT a SSM vráťte na miesto skladovania.
15. Ak spracúvate len vzorky získané z RNA (cDNA) a nezastavujete v bode bezpečného zastavenia, pokračujte časťou [Oprava konca a A-Tailing \(pridávanie bázy A\) na strane 53](#).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, odstred'ujte platničku PCF PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty a skladujte ju pri teplote -25 °C až -15 °C max. 7 dní.

Príprava na protokol

Táto príprava je potrebná na vykonanie krokov protokolu vedúcich k ďalšiemu bezpečnému bodu zastavenia.

1. Vyberte kontroly DNA z miesta uskladnenia.
2. Vytiahnite skúmavku s reagenciou z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 16 Súprava TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (č. položky 20031119)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
TEB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Fragmentácia gDNA

Fragmentácia gDNA

Tento proces fragmentuje gDNA a generuje fragmenty dsDNA s 3' alebo 5' presahmi.

Príprava

1. Pri kvantifikácii vzoriek postupujte podľa odporúčaní v časti [Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28](#).
2. Príprava TEB – produkt premiešajte preklápaním alebo vo vortexe.

Postup

Príprava platničky

Na prípravu platničky použite niektorú z nasledujúcich možností:

- Vzorky gDNA spracujte súbežne so vzorkami cDNA na platničke PCF MIDI.
 - a. Označte platničku PCF MIDI ako LP (príprava knižnice).
 - b. Udržujte ju v chlade a odložte ju nabok na použitie v časti [Prenos fragmentovanej DNA na strane 51](#).
- Vzorky gDNA spracujte súbežne so vzorkami cDNA a platnička PCF PCR je zmrazená.
 - a. Rozmrazte platničku PCF PCR na izbovú teplotu.
 - b. Odstred'ujte pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty.
 - c. Pipetovaním 10-krát premiešajte.
 - d. Označte novú platničku s 96 jamkami ako LP (príprava knižnice).
 - e. Preneste celých 50 µl každej vzorky z platničky PCF PCR do príslušnej jamky na platničke LP MIDI.
 - f. Platničku PCF PCR zlikvidujte.
 - g. Na platničku umiestnite adhezívne tesniace pokrytie a udžujte ju v chlade až do kroku [Prenos fragmentovanej DNA na strane 51](#).
- Spracujte iba vzorky gDNA.
 - a. Označte novú platničku s 96 jamkami ako LP (príprava knižnice).
Ak zastavenie vykonáte v [BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA na strane 52](#), použite platničku PCR.
 - b. Zakryte ju a odložte nabok na použitie v kroku [Prenos fragmentovanej DNA na strane 51](#).

Riedenie gDNA

1. Pri izbovej teplote rozmrazte vzorky gDNA a kontroly DNA.
2. 10-násobným pipetovaním každej vzorky gDNA vzorky premiešajte.
3. Krátkym odstredením skúmavky zhromaždíte kvapky.
4. Premiešajte TEB preklápaním alebo vo vortexe.
5. TEB použite na prípravu každej vzorky gDNA so záverečným objemom 52 µl. Pozrite si nasledujúcu tabuľku, v ktorej nájdete informácie o vstupných množstvách a minimálnych koncentráciách podľa typu vzorky.
 - Analýza vyžaduje minimálnu koncentráciu extrakcie, aby sa získalo najmenej 40 µl TEB z celkového objemu 52 µl.
 - V prípade kontrol DNA použite koncentráciu uvedenú na štítku skúmavky.
 - Na zabránenie strate vzorky nepipetujte do tohto roztoku menej než 2 µl vzorky.

Typ vzorky	Vstupné množstvo (ng)	Minimálna koncentrácia (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrola	40	Pozrite si informácie na štítku skúmavky

Fragmentácia

1. Pridajte 52 µl každej vzorky gDNA do osobitnej jamky skúmavky ultrazvukového prístroja.



UPOZORNENIE

gDNA napíňajte do skúmavky pomaly a dbajte na to, aby sa v dolnej časti skúmavky nenachádzali žiadne vzduchové medzery. Ďalšie informácie nájdete v časti [Analýza na strane 30](#) a v pokynoch od výrobcu.

2. Zaznamenajte si orientáciu prúžku.
3. Pomocou ultrazvukového prístroja fragmentujte gDNA na fragmenty.

Prenos fragmentovanej DNA

1. Overte, či sa rozloženie platničky so vzorkami a indexmi pre každú vzorku zhodujú s chodom, ktorý ste vybrali na analýzu s použitím Analytický modul TSO Comprehensive (EU).
2. Na regeneráciu vzorky postupujte podľa pokynov výrobcu ultrazvukového prístroja.
V prípade niektorých typov skúmaviek určených pre ultrazvukový prístroj sa môže vyžadovať odstreďovanie na konsolidáciu vzorky v skúmavke.
3. V prípade každej fragmentovanej vzorky gDNA použite pipetu s tenkými špičkami na tri prenosy objemu 16,7 µl do prázdnej jamky na platničke LP MIDI.
4. Na platničku LP MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku LP PCR a odstred'ujte ju pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty. Skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C max. 7 dní.

Príprava na protokol

Táto príprava je potrebná na vykonanie krokov protokolu vedúcich k ďalšiemu bezpečnému bodu zastavenia.

Overte, či sú nastavené programy termocykléra po amplifikácii. Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).

1. Pripravte vedro na ľad alebo ekvivalent.
2. Vytiahnite skúmavky s reagensiami z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 17 Balenie TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) (č. položky 20031118)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
ERA1-A	-25 °C až -15 °C	Uchovávať v chlade.	Oprava konca a A-Tailing (pridávanie bázy A)
ERA1-B	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Oprava konca a A-Tailing (pridávanie bázy A)
ALB1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Ligácia adaptérov
LIG3	-25 °C až -15 °C	Uchovávať v chlade.	Ligácia adaptérov
SUA1 (modrý uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Ligácia adaptérov
UMI (biely uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Ligácia adaptérov
STL	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Ligácia adaptérov
EPM	-25 °C až -15 °C	Uchovávať v chlade.	Indexovacie PCR

Tabuľka 18 Balenie TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (č. položky 20031119)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SPB (svetlozelený štítok)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Vyčistenie ligácie
RSB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Vyčistenie ligácie

Tabuľka 19 Balenie TruSight Oncology Comp UP Index Primers (č. položky 20031120)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
UPxx	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte príslušné skúmavky s indexovacím primérom na izbovú teplotu.	Indexovacie PCR

Tabuľka 20 Balenie TruSight Oncology Comp CP Index Primers (č. položky 20031126)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
CPxx	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte príslušné skúmavky s indexovacím primérom na izbovú teplotu.	Indexovacie PCR

Oprava konca a A-Tailing (pridávanie bázy A)

Tento proces slúži na korekciu presahov, ktoré sú výsledkom fragmentácie, pri ktorej vzniknú konce s presahujúcim koncom A, pomocou zmesi End Repair A-Tailing Master Mix (ERA1).

Aktivitou 3' až 5'-exonukleázy v tejto zmesi sa odstránia 3' presahy a aktivitou 5' až 3' polymerázy sa vyplnia 5' presahy. Počas tejto reakcie sú 3' konce sú upravené (A-tailing), aby sa zabránilo ich vzájomnej ligácii počas reakcie ligácie adaptéra.

Príprava

- Podľa nasledujúceho postupu nahrejte dva inkubátory na mikrovzorky pomocou vložiek ohrievacieho bloku MIDI.
 - Nahrejte inkubátor na mikrovzorky na 30 °C.
 - Nahrejte inkubátor na mikrovzorky na 72 °C.
- Prípravte si nasledujúce reagencie.
 - ERA1-A – krátko odstred'te a pipetovaním premiešajte. Uchovávajte v chlade.
 - ERA1-B – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
Skontrolujte výskyt zrazenín. V prípade ich existencie zahrejte skúmavku na 37 °C a pipetovaním obsah miešajte dovtedy, kým sa zrazeniny nerozpustia.
- Prípravte si zmes ERA1 Master Mix do skúmavky do mikroadstredivky.

Tabuľka 21 Zmes ERA1 Master Mix*

Komponent Master Mix	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
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

* Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagentami na strane 34](#).

4. Pomalým 10-násobným pipetovaním premiešajte na zaistenie homogenity a následne krátko odstred'te. Zmes ERA1 master mix uchováajte v chlade.
5. Na prípravu platničky vyberte niektorú z nasledujúcich možností:
 - Ak sú vzorky na platničke MIDI, pripravte ju nasledujúcim spôsobom.
 - a. Označte platničku MIDI ako LP2 (príprava knižnice 2).
 - b. Ak sa niektoré vzorky nachádzajú na osobitných platničkách MIDI, premiestnite všetky vzorky do osobitných jamiek na rovnakej platničke MIDI podľa rozloženia platničky.
 - Ak je platnička zmrazená, pripravte ju nasledujúcim spôsobom.
 - a. Rozmrazte platničku PCF PCR alebo platničku LP PCR na izbovú teplotu.
 - b. Odstred'ujte platničku s otáčkami 280 × g 1 minútu.
 - c. Pipetovaním 10-krát premiešajte.
 - d. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako LP2 (príprava knižnice 2).
 - e. Preneste celých 50 µl každej vzorky z PCF PCR alebo platničky LP PCR do príslušnej jamky na platničke LP2 MIDI.
 - f. Platničku PCF PCR alebo LP PCR zlikvidujte.

Postup

1. Pridajte 10 µl zmesi ERA1 Master Mix do každej jamky na vzorku na platničke LP2 MIDI.
2. Zvyšnú zmes ERA1 Master Mix zlikvidujte.
3. Na platničku LP2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
4. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
5. Inkubujte 30 minút v nahriatom inkubátore na mikrovzorky pri teplote 30 °C.
6. Okamžite prenesť do druhého nahriateho inkubátora na mikrovzorky.
7. Inkubujte 20 minút pri teplote 72 °C.
8. Platničku LP2 MIDI uchováajte 5 minút v chlade.

Ligácia adaptérov

Týmto postupom sa adaptéry ligujú ku koncom fragmentov cDNA a/alebo gDNA.

Analýza TSO Comprehensive (EU) obsahuje adaptéry SUA1 a UMI.

- Adaptéry SUA1 použité v prípade vzoriek RNA.
- Adaptéry UMI použité v prípade vzoriek DNA.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.

- ALB1 – premiešajte min. 10 sekúnd vo vortexe a potom krátko odstred'te.
- LIG3 – krátko odstred'te a pipetovaním premiešajte. Uchovávajte v chlade.
- SUA1 – premiešajte min. 10 sekúnd vo vortexe a potom krátko odstred'te.
- UMI – premiešajte min. 10 sekúnd vo vortexe a potom krátko odstred'te.
- STL – produkt si odložte na použitie v rámci procedúry.

Postup

1. Vytiahnite platničku LP2 MIDI z ľadu alebo ekvivalentu.
2. Pridajte 60 µl ALB1 do každej jamky na vzorku na platničke LP2 MIDI. ALB1 je viskózný roztok. Pipetujte pomaly, aby ste minimalizovali tvorbu bublín.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 5 µl LIG3.
4. Adaptéry pridajte nasledujúcim spôsobom.
Nepoužívajte spolu rôzne typy adaptérov.
 - **[Jamky na vzorky RNA]** – Pridajte 10 µl SUA1 (modrý uzáver) do každej vzorky získanej z RNA.
 - **[Jamky na vzorky DNA]** – Pridajte 10 µl UMI (biely uzáver) do každej vzorky získanej z DNA.
5. Na platničku LP2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
6. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
7. Inkubujte 30 minút pri izbovej teplote.
8. Premiešajte STL vo vortexe a potom krátko odstred'te.
9. Pridajte 5 µl STL do každej jamky na vzorku na platničke LP2 MIDI.
10. Na platničku LP2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
11. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.

Vyčistenie ligácie

V tomto postupe sa používa SPB na purifikáciu adaptérom ligovaných fragmentov cDNA alebo gDNA a odstraňujú sa nežiaduce produkty. Gulôčky sa premývajú dvakrát pomocou čerstvo pripraveného 80 % etanolu. Elúcia adaptérom ligovaných vzoriek sa vykonáva použitím pufru RSB.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - SPB – dbajte na to, aby sa gulôčky nachádzali 30 minút v prostredí s izbovou teplotou.
 - RSB – uložte na použitie v postupe.
2. Do 15 ml alebo 50 ml kónickej skúmavky si pripravte čerstvý 80 % EtOH.

Tabuľka 22 Príprava čerstvého 80 % etanolu

Reagencia	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
100 % EtOH, pure	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. Čerstvý 80 % EtOH premiešajte vo vortexe.
4. Pripravte magnet.

Postup

Viazanie

1. Premiešajte SPB vo vortexe 1 minútu, aby sa guľôčky resuspendovali.
2. Ihneď pridajte 112 µl SPB do každej jamky na vzorku na platničke LP2 MIDI.
Ak na dávkovanie SPB používate úzku vaničku, zahrňte faktor prebytku 1,15 v prípade, že vytvárate postačujúce alikvoty materiálu na vzorku. Po pridaní SPB do každej jamky na vzorku zlikvidujte všetok zvyšný materiál.
3. Na platničku LP2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
4. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
5. Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
6. Vložte platničku LP2 MIDI do magnetického stojana na 10 minút.
7. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky na vzorku.

Premývanie

1. Guľôčky premyte podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Platničku LP2 MIDI ponechajte na magnetickom stojane a do každej jamky na vzorku pridajte 200 µl čerstvo pripraveného 80 % EtOH.
 - b. Počkajte 30 sekúnd.
 - c. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky na vzorku.
2. Guľôčky **druhý** raz premyte.
3. Na odstránenie zvyškového EtOH z každej jamky použite pipetu s jemnými špičkami.
4. Nepoužitý 80 % EtOH zlikvidujte.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku LP2 MIDI z magnetického stojana.

2. RSB preklopte alebo premiešajte vo vortexe.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 27,5 µl RSB.
4. Na platničku LP2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
6. Inkubujte 2 minúty pri izbovej teplote.
7. Vložte platničku LP2 MIDI do magnetického stojana na 2 minúty.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako LS (Library Samples, vzorky knižnice).
9. Preneste 25 µl každého eluátu z platničky LP2 MIDI do príslušnej jamky na platničke LS PCR.
10. Prázdnu platničku LP2 MIDI zlikvidujte.

Indexovacie PCR

V tomto kroku sa fragmenty knižnice amplifikujú použitím primérov, ktoré pridávajú indexovacie sekvencie na multiplexovanie vzoriek. Výsledný produkt obsahuje kompletnú knižnicu cDNA a/alebo DNA fragmentov lemovaných adaptérmi požadovanými na generovanie klastrov.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - EPM – uchovávajte v chlade.
 - UPxx – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstredíte. UPxx je indexovací primér zvolený na obrazovke Create Run (Vytvorenie chodu) v softvéri Local Run Manager počas nastavovania chodu.
 - CPxx – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstredíte. CPxx je indexovací primér zvolený na obrazovke Create Run (Vytvorenie chodu) v softvéri Local Run Manager počas nastavovania chodu.
2. Počas nastavovania chodu dbajte na to, aby sa indexy pre každú vzorku zhodovali s chodom naplánovaným v Analytický modul TSO Comprehensive (EU). Pri výbere indexu musíte postupovať podľa pokynov uvedených v kapitole [Počet knižníc a výber indexov na strane 36](#).



UPOZORNENIE

Nezhoda medzi vzorkami a indexovacími primérmi spôsobí vykazovanie nesprávnych výsledkov v dôsledku toho, že nedôjde k pozitívnej identifikácii vzorky.

Postup

1. Pridajte 5 µl príslušného indexovacieho priméru (UPxx alebo CPxx) do zodpovedajúcej jamky na vzorku na platničke LS PCR podľa zvolených indexov.

**UPOZORNENIE**

Naraz vždy otvárajte a manipulujte iba s jednou skúmavkou s indexovacím primérom. Každú skúmavku s indexom ihneď po použití uzavrite novým viečkom. Indexovacie priméry nepoužívajte spoločne.

2. 5 sekúnd miešajte EPM vo vortexe a potom krátko odstred'te.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 20 µl EPM.
4. Na platničku LS PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
5. Pretrepávajte pri otáčkach 1 200 ot./min po dobu 1 minúty.
6. Vráťte predamplifikačné reagenty na miesto uskladnenia.

**UPOZORNENIE**

Všetky nasledujúce kroky vykonávajte v postamplifikačnej oblasti, aby nedošlo k prenosu produktu amplifikácie.

7. Odstred'ujte platničku LS PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty.
8. Vložte do vopred naprogramovaného postamplifikačného termocykléra a spustite program I-PCR. Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#). Ak budete pokračovať časťou [Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59](#), postupujte podľa pokynov na rozmrazenie reagentů uvedených v časti Příprava kroků protokolu.
9. Po dokončení programu I-PCR odstred'ujte platničku LS PCR pri otáčkach 280 x g po dobu 1 minúty.
10. Platničku označte ako ALS (Amplified Library Samples, amplifikované vzorky knižnice).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, skladujte platničku ALS PCR pri teplote -25 °C až -15 °C max. 30 dní.

Príprava na protokol

Táto príprava je potrebná na vykonanie krokov protokolu vedúcich k nočnej hybridizácii.

1. Overte, či sú nastavené programy termocykléra po amplifikácii. Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).
2. Vytiahnite skúmavky s reagensiami z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 23 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
TCB1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Nastavenie prvej hybridizácie

Tabuľka 24 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
TCA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie prvej hybridizácie

Tabuľka 25 Balenie TruSight Oncology Comp Content Set (č. položky 20031122)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
OPR1 (červený uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie prvej hybridizácie
OPD2 (biely uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie prvej hybridizácie

Nastavenie prvej hybridizácie

Počas tohto procesu sa pool oligonukleotidov hybridizuje na knižnice cDNA a pool oligonukleotidov sa hybridizuje na knižnice gDNA pripravené v kroku [Indexovacie PCR na strane 57](#). Na obohatenie cielených oblastí sa vyžadujú dva kroky hybridizácie. V rámci prvej hybridizácie sa počas noci hybridizujú oligonukleotidy na knižnice cDNA alebo gDNA (8 hodín až 24 hodín).

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagensie.
 - TCB1 – zahrievajte skúmavku na 37 °C po dobu 5 minút. Obsah 10 sekúnd premiešavajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - TCA1 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - OPR1 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - OPD2 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.

2. Ak bola platnička ALS PCR uložená na mieste uskladnenia, rozmrazte ju na izbovú teplotu a 1 minútu odstred'ujte pri otáčkach 280 × g. Pipetou premiešajte.
3. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako HYB1 (hybridizácia 1).

Postup

1. Preneste 20 µl každej knižnice cDNA a gDNA z platničky ALS PCR do príslušnej jamky na platničke HYB1 PCR.
2. Na platničku ALS PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie a odložte ju nabok. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
3. Skontrolujte výskyt zrazenín v TCB1. Ak sú prítomné, znova zahrejte skúmavku a miešajte jej obsah vo vortexe dovtedy, kým sa kryštály nerozpustia.
4. Pridajte 15 µl TCB1 do každej jamky knižnice na platničke HYB1 PCR.
5. Pridajte 10 µl TCA1 do každej jamky knižnice na platničke HYB1 PCR.
6. Pridajte sondy.
Nepoužívajte spolu rôzne typy sond. Do každej jamky pridajte iba jednu súpravu sondy.
 - **[Jamky knižnice RNA]** – Pridajte 5 µl OPR1 (červený uzáver) do každej knižnice získanej z RNA.
 - **[Jamky knižnice DNA]** – Pridajte 5 µl OPD2 (biely uzáver) do každej knižnice získanej z DNA.
7. Na platničku HYB1 PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
8. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1 200 ot./min.
9. Vložte do termocykléra a spustite program HYB1.
Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).
10. Hybridizujte pri teplote 57 °C minimálne 8 hodín a maximálne 24 hodín.
11. Vráťte hybridizačné reagenty na miesto uskladnenia.
12. Platničku ALS PCR skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C max. 30 dní.

Príprava na protokol

Táto príprava je potrebná na vykonanie krokov protokolu vedúcich k ďalšiemu bezpečnému bodu zastavenia. Na začiatku 2. dňa vytiahnite skúmavky s reagentami z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 26 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SMB (tmavomodrý štítok)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Prvé zachytenie cieľov Druhé zachytenie cieľov

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
ET2	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Prvé zachytenie cieľov Druhé zachytenie cieľov
HP3	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Prvé zachytenie cieľov Druhé zachytenie cieľov Normalizácia knižníc
TCB1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Nastavenie druhej hybridizácie
RSB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Druhé zachytenie cieľov Vyčistenie amplifikovanej obohatenej knižnice

Tabuľka 27 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
EE2	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Prvé zachytenie cieľov Druhé zachytenie cieľov Normalizácia knižníc
EEW	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Prvé zachytenie cieľov
TCA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie druhej hybridizácie

Tabuľka 28 Balenie TruSight Oncology Comp Content Set (č. položky 20031122)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
OPR1 (červený uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie druhej hybridizácie
OPD2 (biely uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie druhej hybridizácie

Prvé zachytenie cieľov

V tomto kroku sa používa SMB na zachytenie sond hybridizovaných na ciele oblasti záujmu. Gulôčky sa trikrát premývajú použitím EEW. Elúcia obohatených knižníc sa vykonáva pomocou čerstvo pripravenej elučnej zmesi EE2 + HP3 Elution Mix a neutralizácia sa vykonáva pomocou ET2.

Príprava

1. Nahrejte inkubátor na mikrovzorky pomocou vložky ohrievacieho bloku MIDI na 57 °C.
2. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - EEW – premiešavajte vo vortexe 1 minútu.

- EE2 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - HP3 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - SMB – dbajte na to, aby sa guľôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou. V rámci tejto procedúry používajte **SMB**, nie SPB.
 - ET2 – produkt si pripravte na ďalšie použitie v rámci procedúry.
3. Pripravte si čerstvú elučnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix v skúmavke do mikroadstredivky.

Tabuľka 29 Elučná zmes EE2 + HP3 Elution Mix na prvé zachytenie cieľov*

Komponent Elution Mix (elučná zmes)	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagensiami na strane 34](#).

4. Premiešajte zmes EE2 + HP3 Elution Mix vo vortexe a potom krátko odstred'te. Odložte nabok pre krok [Elúcia na strane 63](#).
5. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako CAP1 (1. zachytenie).
6. Pripravte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vytiahnite platničku HYB1 PCR z termocykléra.
2. Odstred'ujte platničku HYB1 PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty.
3. Miešajte SMB vo vortexe 1 minútu, aby sa resuspendovali guľôčky.
Ak je prítomná zrazenina alebo guľôčková peleta, dbajte na to, aby ste dosiahli izbovú teplotu, pipetovaním nahor a nadol uvoľnite peletu a potom miešajte vo vortexe na resuspendovanie.
4. Do každej jamky knižnice platničky CAP1 MIDI ihneď pridajte 150 µl SMB.
Ak na dávkovanie SMB používate úzku vaničku, zahrňte faktor prebytku 1,15 v prípade, že vytvárate alikvoty na získanie dostatku materiálu na vzorku.
5. Po pridaní SMB do každej jamky na vzorku zlikvidujte všetok zvyšný materiál.
6. Nastavte pipetu na 50 µl a preneste celý objem každej knižnice z platničky HYB1 PCR do príslušnej jamky na platničke CAP1 MIDI.
7. Prázdnu platničku HYB1 PCR zlikvidujte.
8. Na platničku CAP1 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
9. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.

10. Inkubujte 25 minút v nahriatom inkubátore na mikrovzorky pri teplote 57 °C.
11. Vložte platničku CAP1 MIDI do magnetického stojana na 2 minúty.
12. Platničku nechajte na magnetickom stojane. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.



UPOZORNENIE

Ihneď pokračujte ďalším krokom ([Premývanie na strane 63](#)). Dbajte na to, aby sa guľôčková peleta dlhší čas neusádzala bez prítomnosti kvapaliny.

Premývanie

1. Guľôčky premyte podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Vytiahnite platničku CAP1 MIDI z magnetického stojana.
 - b. Do každej jamky na vzorku pridajte 200 µl EEW.
 - c. Pipetou nastavenou na 150 µl zmes premiešajte minimálne 10-krát. Dbajte na to, aby sa všetky guľôčky resuspendovali.

Dbajte na to, aby nezostali žiadne guľôčkové pelety – opatrne aspirujte celý roztok s guľôčkami do špičky. Vizualne skontrolujte spodnú časť každej jamky. Ak je prítomná guľôčková peleta, nahnite špičku pipety smerom k pelete počas krokov premývania, aby sa peleta uvoľnila. Dbajte na to, aby bola guľôčková peleta úplne ponorená v roztoku. Roztok by mal mať tmavohnedú farbu a homogénnu konzistenciu.
 - d. Na platničku CAP1 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
 - e. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
 - f. Pretrepávajte 4 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
 - g. Inkubujte 5 minút v inkubátore na mikrovzorky pri teplote 57 °C.
 - h. Vložte platničku CAP1 MIDI do magnetického stojana na 2 minúty.
 - i. Platničku nechajte na magnetickom stojane. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
2. Guľôčky **druhý** raz premyte.
3. Guľôčky **tretí** raz premyte.
4. Na odstránenie zvyškového EEW z každej jamky použite pipetu s jemnými špičkami.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku CAP1 MIDI z magnetického stojana.
2. Premiešajte zmes EE2 + HP3 Elution Mix vo vortexe a potom krátko odstred'te.
3. Opatrne pridajte 17 µl zmesi EE2 + HP3 Elution Mix do každej jamky knižnice na platničke CAP1 MIDI.
4. Zlikvidujte zvyšnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix.
5. Na platničku CAP1 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.

Riadne utesnite okraje a jamky.

6. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako ELU1 (elúcia 1).
9. Premiešajte ET2 vo vortexe a potom krátko odstredte.
10. Pridajte 5 µl ET2 do každej príslušnej jamky knižnice na novej platničke ELU1 PCR.
11. Opatrne preneste 15 µl eluátu z každej jamky platničky CAP1 MIDI do príslušnej jamky na platničke ELU1 PCR.
12. Prázdnu platničku CAP1 MIDI zlikvidujte.
13. Na platničku ELU1 PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
14. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1 200 ot./min.
15. Vráťte EEW na miesto uskladenia.

Nastavenie druhej hybridizácie

Tento krok vedie k druhému viazaniu cielených oblastí obohatených knižníc cDNA a/alebo gDNA so záchytnými sondami. Druhá hybridizácia zaisťuje vysokú špecifickosť zachytených oblastí. Na zaistenie optimálneho obohatenia knižníc vykonajte druhú hybridizáciu pri teplote 57 °C (min. 1,5 hodiny, max. 4 hodiny).

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - TCB1 – zahrievajte skúmavku na 37 °C po dobu 5 minút. Obsah 10 sekúnd premiešavajte vo vortexe a potom krátko odstredte.
 - TCA1 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstredte.
 - OPR1 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstredte.
 - OPD2 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstredte.

Postup

1. Skontrolujte výskyt zrazenín v TCB1. Ak sú prítomné, znova zahrejte skúmavku a miešajte jej obsah vo vortexe dovtedy, kým sa kryštály nerozpustia.
2. Pridajte 15 µl TCB1 do každej jamky knižnice na platničke ELU1 PCR.
3. Pridajte 10 µl TCA1 do každej jamky knižnice.
4. Do každej jamky pridajte rovnakú sondu použitú počas prvej hybridizácie. Do každej jamky pridajte iba jednu súpravu sondy.

Nepoužívajte spolu rôzne typy sond.

- **[Jamky knižnice RNA]** – Pridajte 5 µl OPR1 (červený uzáver) do každej knižnice získanej z RNA.

- **[Jamky knižnice DNA]** – Pridajte 5 µl OPD2 (biely uzáver) do každej knižnice získanej z DNA.
- Na platničku ELU1 PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
 - Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1 200 ot./min.
 - Vložte do termocykléra a spustite program HYB2.
Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).
 - Hybridizujte pri teplote 57 °C minimálne 1,5 hodiny, max. 4 hodiny.
 - Vráťte hybridizačné reagenty na miesto uskladnenia.

Druhé zachytenie cieľov

V tomto kroku sa používa SMB na zachytenie sond hybridizovaných na cielej oblasti záujmu. Gulôčky sú premývané jedenkrát použitím RSB. Elúcia obohatených knižníc sa vykonáva pomocou čerstvo pripravenej elučnej zmesi EE2 + HP3 Elution Mix a neutralizácia sa vykonáva pomocou ET2.

Príprava

- Nahrejte inkubátor na mikrovzorky pomocou vložky ohrievacieho bloku MIDI na 57 °C.
- Prípravte si nasledujúce reagenty.
 - EE2 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - HP3 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - SMB – dbajte na to, aby sa gulôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou.
V rámci tejto procedúry používajte **SMB**, nie SPB.
 - RSB – uložte na použitie v postupe.
 - ET2 – produkt si pripravte na ďalšie použitie v rámci procedúry.
- Prípravte si čerstvú elučnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix v skúmavke do mikroadstredivky.

Tabuľka 30 Elučná zmes EE2 + HP3 Elution Mix na druhé zachytenie cieľa*

Komponent Elution Mix (elučná zmes)	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagentami na strane 34](#).

- Premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te. Odložte nabok pre krok [Elúcia na strane 67](#).
- Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako CAP2 (2. zachytenie).
- Prípravte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vytiahnite platničku ELU1 PCR z termocykléra.
2. Odstred'ujte platničku ELU1 PCR s otáčkami 280 × g po dobu 1 minúty.
3. Miešajte SMB vo vortexe 1 minútu, aby sa resuspendovali guľôčky.
Ak je prítomná zrazenina alebo guľôčková peleta, dbajte na to, aby ste dosiahli izbovú teplotu, pipetovaním nahor a nadol uvoľnite peletu a potom miešajte vo vortexe na resuspendovanie.
4. Do každej jamky knižnice platničky CAP2 MIDI ihneď pridajte 150 µl SMB.
Ak na dávkovanie SMB používate úzku vaničku, zahrňte faktor prebytku 1,15 v prípade, že vytvárate alikvoty na získanie dostatku materiálu na vzorku.
5. Po pridaní SMB do každej jamky na vzorku zlikvidujte všetok zvyšný materiál.
6. Nastavte pipetu na 50 µl a preneste celý objem každej knižnice z platničky ELU1 PCR do príslušnej jamky na platničke CAP2 MIDI.
7. Prázdnu platničku ELU1 PCR zlikvidujte.
8. Na platničku CAP2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
9. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
10. Inkubujte 25 minút v inkubátore na mikrovzorky pri teplote 57 °C.
Ak pokračujete [Amplifikácia obohatenej knižnice na strane 69](#), postupujte podľa pokynov v časti [Príprava na protokol](#).
11. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
12. Platničku CAP2 MIDI nechajte na magnetickom stojane. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.



UPOZORNENIE

Ihneď pokračujte ďalším krokom ([Premývanie na strane 66](#)). Dbajte na to, aby sa guľôčková peleta dlhší čas neusádzala bez prítomnosti kvapaliny.

Premývanie

1. Vytiahnite platničku CAP2 MIDI z magnetického stojana.
2. RSB preklopte alebo premiešajte vo vortexe.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 200 µl RSB.
4. Na platničku CAP2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Pretrepávajte 4 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
6. Vložte platničku do magnetického stojana na 2 minúty.

7. Platničku nechajte na magnetickom stojane. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
8. Na odstránenie zvyškového RSB z každej jamky použite pipetu s jemnými špičkami.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku CAP2 MIDI z magnetického stojana.
2. Premiešajte zmes EE2 + HP3 Elution Mix vo vortexe a potom krátko odstred'te.
3. Pridajte 22 µl zmesi EE2 + HP3 Elution Mix do každej jamky knižnice na platničke CAP2 MIDI.
4. Zlikvidujte zvyšnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix.
5. Na platničku CAP2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Riadne utesnite okraje a jamky.
6. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako ELU2 (elúcia 2).
9. Premiešajte ET2 vo vortexe a potom krátko odstred'te.
10. Pridajte 5 µl ET2 do každej príslušnej jamky knižnice v novej platničke ELU2 PCR.
11. Opatrne preneste 20 µl eluátu z každej jamky platničky CAP2 MIDI do príslušnej jamky na platničke ELU2 PCR.
12. Prázdnu platničku CAP2 MIDI zlikvidujte.
13. Na platničku ELU2 PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
14. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1 200 ot./min.
15. Vráťte SMB, EE2, HP3, RSB a ET2 na miesto uskladnenia.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, odstred'ujte platničku ELU2 PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty a skladujte ju pri teplote -25 °C až -15 °C max. 7 dní.

Príprava na protokol

Táto príprava je potrebná na vykonanie krokov protokolu vedúcich k ďalšiemu bezpečnému bodu zastavenia.

1. Pripravte vedro na ľad alebo ekvivalent.
2. Vytiahnite skúmavky s reagensiami z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 31 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
PPC3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Amplifikácia obohatenej knižnice

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
EPM	-25 °C až -15 °C	Uchovávať v chlade.	Amplifikácia obohatenej knižnice

Tabuľka 32 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SPB (svetlozelený štítok)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Vyčistenie amplifikovanej obohatenej knižnice
RSB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Vyčistenie amplifikovanej obohatenej knižnice Príprava na sekvenovanie

Amplifikácia obohatenej knižnice

V tomto kroku sa používajú priméry na amplifikáciu obohatených knižníc.

Príprava

1. Ak bola platnička ELU2 skladovaná, rozmrazte ju na izbovú teplotu a 1 minútu odstred'ujte pri otáčkach 280 × g.

Postup

1. Premiešajte PPC3 vo vortexe a potom krátko odstred'te.
2. Pridajte 5 µl PPC3 do každej jamky knižnice platničky ELU2 PCR.
3. 5 sekúnd premiešajte EPM vo vortexe a potom krátko odstred'te.
4. Pridajte 20 µl EPM do každej jamky knižnice.
5. Na platničku ELU2 PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
6. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1 200 ot./min.
7. Vložte do termocykléra a spustite program EL-PCR.
Pozrite si časť [Programovanie termocykléra na strane 43](#).
Ak pokračujete [Normalizácia knižníc na strane 72](#), postupujte podľa pokynov k rozmrazeniu v časti [Príprava na protokol](#).
8. Vráťte PPC3 a EPM na miesto uchovávanía.

Vyčistenie amplifikovanej obohatenej knižnice

V tomto kroku sa používa SPB na purifikáciu obohatených knižníc od nežiaducich komponentov reakcie. Gulôčky sa premývajú dvakrát pomocou čerstvo pripraveného 80 % etanolu. Elúcia knižníc sa vykonáva použitím RSB.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - SPB – dbajte na to, aby sa gulôčky nachádzali 30 minút v prostredí s izbovou teplotou. V rámci tohto postupu používajte **SPB**, nie SMB.
 - RSB – uložte na použitie v postupe.
2. Do 15 ml alebo 50 ml kónickej skúmavky si pripravte čerstvý 80 % etanol.

Tabuľka 33 Príprava čerstvého 80 % etanolu

Reagencia	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
100 % EtOH, pure	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. Čerstvý 80 % EtOH premiešajte vo vortexe.
4. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako BIND2 (vyčistenie väzby).
5. Pripravte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vytiahnite platničku ELU2 PCR z termocykléra.
2. Odstred'ujte platničku ELU2 PCR pri rýchlosti 280 × g po dobu 1 minúty.
3. Premiešajte SPB vo vortexe 1 minútu, aby sa guľôčky resuspendovali.
4. Do každej jamky knižnice platničky BIND2 MIDI ihneď pridajte 110 µl SPB.
5. Preneste 50 µl každej knižnice z platničky ELU2 PCR do príslušnej jamky na platničke BIND2 MIDI.
6. Prázdnu platničku ELU2 PCR zlikvidujte.
7. Na platničku BIND2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
8. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
9. Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
10. Umiestnite platničku BIND2 MIDI do magnetického stojana na 5 minút.
11. Platničku nechajte na magnetickom stojane. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.

Premývanie

1. Guľôčky premyte podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Platničku BIND2 MIDI ponechajte na magnetickom stojane a do každej jamky na vzorku pridajte 200 µl čerstvo pripraveného 80 % EtOH.
 - b. Počkejte 30 sekúnd.
 - c. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
2. Guľôčky **druhý** raz premyte.
3. Na odstránenie zvyškového EtOH z každej jamky použite pipetu s jemnými špičkami.
4. Nepoužitý 80 % EtOH zlikvidujte.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku BIND2 MIDI z magnetického stojana.
2. Premiešajte RSB preklopením alebo vo vortexe.
3. Pridajte 32 µl RSB do každej jamky knižnice.
4. Na platničku BIND2 MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
6. Inkubujte 2 minúty pri izbovej teplote.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako PL (purifikované knižnice).
9. Preneste 30 µl každého eluátu z platničky BIND2 MIDI do príslušnej jamky na platničke PL PCR.
10. Prázdnu platničku BIND2 MIDI zlikvidujte.
11. Na platničku PL PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
12. Vráťte SPB a RSB na miesto uskladnenia.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, odstredíte platničku PL PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty a skladujte ju pri teplote -25 °C až -15 °C max. 30 dní.

Príprava na protokol

Táto príprava je potrebná na vykonanie krokov protokolu vedúcich k ďalšiemu bezpečnému bodu zastavenia.

1. Vytiahnite skúmavky s reagensiami z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 34 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
LNA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Normalizácia knižníc
EE2	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Normalizácia knižníc

Tabuľka 35 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
LNB1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Normalizácia knižníc
HP3	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Normalizácia knižníc Príprava na sekvenovanie

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
LNW1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Normalizácia knižníc
LNS1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Normalizácia knižníc

2. Ak v rovnaký deň pokračujete krokom [Príprava na sekvenovanie na strane 75](#), postupujte podľa krokov rozmrazenia v časti [Príprava na protokol](#).

Normalizácia knižníc

V tomto procese sa používa produkt LNB1 spolu s aditívami (LNA1) na normalizáciu množstva každej knižnice na zaistenie jednotného zastúpenia knižníc v združených knižniciach (pool). Gulôčky sa dvakrát premyjú pomocou produktu LNW1. Elúcia knižníc sa vykonáva pomocou čerstvo pripravenej zmesi EE2 + HP3 Elution Mix s následnou neutralizáciou pomocou LNS1.

Príprava

- Prípravte si nasledujúce reagenty.
 - LNB1 – dbajte na to, aby sa gulôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou.
 - LNA1 – premiešajte vo vortexe.
 - EE2 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - HP3 – premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
 - LNW1 – premiešajte vo vortexe. Produkt si odložte na použitie v rámci procedúry.
 - LNS1 – premiešajte vo vortexe. Produkt si odložte na použitie v rámci procedúry.
- Miešajte LNB1 vo vortexe 1 minútu, aby sa resuspendovali gulôčky.
Preklápaním skúmavky s LNB1 zaistíte resuspendovanie všetkých gulôčok.
- Pomocou pipety nastavenej na objem 800 µl pipetujte LNB1 10-krát nahor a nadol na zaistenie resuspenzie.
- Okamžite si pripravte čerstvú zmes LNA1 + LNB1 Master Mix v kónickej skúmavke.



UPOZORNENIE

Úplne resuspendujte gulôčkovú peletu LNB1 v spodnej časti skúmavky, aby ste zabránili nekonzistentnej hustote klastra.

Tabuľka 36 LNA1+LNB1 Master Mix*

Komponent Master Mix	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagensiami na strane 34](#).

- Premiešajte zmes LNA1 + LNB1 Master Mix vo vortexe. Odložte nabok pre krok [Viazanie na strane 73](#).
- Prípravte si čerstvú elučnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix v skúmavke do mikroadstredivky.

Tabuľka 37 EE2+HP3 Elution Mix na normalizáciu knižníc*

Komponent Elution Mix (elučná zmes)	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagensiami na strane 34](#).

- Premiešajte čerstvú elučnú zmes vo vortexe a potom krátko odstredíte. Odložte nabok pre krok [Elúcia na strane 74](#).
- Ak bola platnička PL PCR uložená na mieste uskladnenia, rozmrazte ju na izbovú teplotu, 1 minútu odstredíte pri otáčkach 280 × g. Pipetou premiešajte.
- Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako BBN (Bead-Based Normalization, guľôčková normalizácia).
- Prípravte magnet.

Postup

Viazanie

- Premiešajte zmes LNA1+LNB1 Master Mix vo vortexe.
- Okamžite pridajte 45 µl zmesi LNA1 + LNB1 Master Mix do každej jamky knižnice na platničke BBN MIDI.
- Zvyšnú zmes LNA1 + LNB1 Master Mix zlikvidujte.
- Preneste 20 µl každej knižnice z platničky PL PCR do príslušnej jamky na platničke BBN MIDI.
- Na platničku BBN MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Riadne utesnite okraje a jamky.
- Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min po dobu 30 minút.
- Na platničku PL PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie a vráťte platničku na miesto uskladnenia.
- Vložte platničku BBN MIDI do magnetického stojana na 2 minúty.
- Platničku nechajte na magnetickom stojane. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.

Premývanie

- Guľôčky premyte podľa nasledujúceho postupu.
 - Vytiahnite platničku BBN MIDI z magnetického stojana.
 - Pridajte 45 µl LNW1 do každej jamky knižnice.

- c. Na platničku BBN MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
 - d. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min po dobu 5 minút.
 - e. Vložte platničku BBN MIDI do magnetického stojana na 2 minúty.
 - f. Platničku nechajte na magnetickom stojane. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
2. Guľôčky **druhý** raz premyte.
 3. Na odstránenie zvyškového supernatantu z každej jamky použite pipetu s jemnými špičkami.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku BBN MIDI z magnetického stojana.
2. Premiešajte zmes EE2 + HP3 Elution Mix vo vortexe a potom krátko odstredíte.
3. Pridajte 32 µl zmesi EE2 + HP3 Elution Mix do každej jamky knižnice na platničke BBN MIDI.
4. Zvyšnú elučnú zmes zlikvidujte.
5. Na platničku BBN MIDI umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
6. Pretrepávajte 2 minúty pri otáčkach 1800 ot./min.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako NL (Normalized Libraries, normalizované knižnice).
9. Opatrne preneste 30 µl eluátu z každej jamky knižnice platničky BBN MIDI do príslušnej jamky na platničke NL PCR.



UPOZORNENIE

Ak sa guľôčky aspirovali do pipetových špičiek, guľôčky nadávkujte naspäť na platničky v magnetickom stojane a počkajte, kým nebude kvapalina priehľadná (približne 2 minúty) pred tým, než vykonáte ďalší krok postupu.

10. Prázdnu platničku BBN MIDI zlikvidujte.
11. Premiešajte LNS1 vo vortexe.
12. Pridajte 30 µl LNS1 do každej jamky knižnice na novej platničke NL PCR.
13. Pipetovaním 5-krát premiešajte.
14. Na platničku NL PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
15. Produkty LNB1, LNA1, EE2, LNW1 a LNS1 vráťte na miesto uskladnenia.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, odstredíte platničku NL PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty a skladujte ju pri teplote -25 °C až -15 °C max. 32 dní.

Príprava na protokol

Táto príprava je potrebná na vykonanie krokov protokolu vedúcich k sekvenovaniu.

Začnite s prípravou spotrebných materiálov na sekvenovanie zo súpravy NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) (č. položky 20028871) najmenej jednu hodinu pred použitím.

1. Vyberte pufer na riedenie knižníc (HT1) z miesta uskladnenia s teplotou -25 °C až -15 °C. Rozmrazte na izbovú teplotu. Po rozmrazení uchovávajte v chlade.
2. Postupujte podľa pokynov na prípravu uvedených v *Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)* pre iný spotrebný materiál v súprave.
 - Kazeta s reagensiami NextSeq 550Dx High Output v2 (300 cyklov)
 - Kazeta s pufrom NextSeq 550Dx v2 (300 cyklov)
 - Kazeta s prietokovými článkami NextSeq 550Dx High Output v2.5 (300 cyklov)
3. Vytiahnite skúmavky s reagensiami z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 38 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
PhiX Internal Control (interná kontrolná knižnica PhiX) (PX3 alebo PhiX)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu. Po rozmrazení uchovávajte v chlade.	Príprava na sekvenovanie

Tabuľka 39 Balenie TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
HP3	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Príprava na sekvenovanie
RSB (ružový štítok)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Príprava na sekvenovanie

Príprava na sekvenovanie

Každý chod sekvenovania DNA a RNA by mal zahŕňať pozitívnu kontrolu a NTC. Každá NTC pre DNA a RNA sa sekvenuje podľa potreby opakovane, t. j. každý chod obsahuje NTC. Každý chod DNA a RNA zahŕňa osobitnú pozitívnu kontrolu.

Príprava

1. Pozrite si pokyny v časti *Počet knižníc a výber indexov na strane 36*.
2. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako dHP3 (zriedená HP3).
3. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako dPhiX (zriedená PhiX).
4. Zahrejte ohrievací blok na 96 °C pre skúmavky do mikroadstredivky.
5. Pripravte vedro na ľad alebo ekvivalent.

Riedenie a denaturácia kontroly PhiX

1. Premiešajte HP3 vo vortexe a následne krátko odstred'te.
2. V skúmavke do mikroadstredivky dHP3 zlučte nasledujúce objemy.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Premiešajte dHP3 vo vortexe a následne krátko odstred'te.
4. RSB preklopte alebo premiešajte vo vortexe.
5. Premiešajte kontrolu PhiX vo vortexe a následne krátko odstred'te.
6. V skúmavke do mikroadstredivky dPhiX zlučte nasledujúce objemy.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl kontroly PhiX
7. Pridajte 10 µl dHP3 do skúmavky dPhiX.
8. Skúmavku dHP3 zlikvidujte.
9. Premiešajte obsah skúmavky dPhiX vo vortexe a následne krátko odstred'te.
10. Inkubujte dPhiX pri izbovej teplote 5 minút, aby došlo k denaturácii.
11. Premiešajte HT1 vo vortexe.
12. Ihneď pridajte 980 µl vopred schladeného produktu HT1 do dPhiX.
13. Premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
14. PhiX udržiavajte v chlade až do momentu použitia na prípravu druhého roztoku.
Záverečná koncentrácia je 20 pM dPhiX.
15. Vráťte produkty PhiX, HP3 a RSB na miesto uskladnenia.

Združovanie (pool) a denaturácia knižníc na analýzu TSO Comprehensive (EU)

1. Ak bola platnička NL PCR uložená na mieste uskladnenia, rozmrazte ju na izbovú teplotu a 1 minútu odstred'ujte pri otáčkach 280 × g.

2. Pomocou multikanálovej pipety nastavenej na 30 µl opatrne päťkrát premiešajte knižnice na platničke NL PCR.

Na každú knižnicu použite nové špičky.



UPOZORNENIE

Na dosiahnutie požadovanej účinnosti sa knižnice musia riadne premiešať.

3. Vyberte niektorú z nasledujúcich možností na združovanie (pool), denaturáciu a riedenie knižníc.
 - **[Možnosť 1]** Súbežné sekvenovanie knižníc získaných zo vzoriek RNA a DNA. Pozrite si [Možnosť 1: Knižnice DNA a RNA spolu na strane 77](#).
 - **[Možnosť 2]** Knižnice sekvenovania získané iba zo vzoriek DNA. Pozrite si [Možnosť 2: Iba knižnice DNA na strane 78](#).
 - **[Možnosť 3]** Knižnice sekvenovania získané iba zo vzoriek RNA. Pozrite si [Možnosť 3: Iba knižnice RNA na strane 79](#).

Možnosť 1: Knižnice DNA a RNA spolu

1. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako PRL (združené knižnice RNA).
2. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako PDL (združené knižnice DNA).
3. Preneste 10 µl každej normalizovanej knižnice RNA (cDNA) z platničky NL do skúmavky PRL. Nezdužujte dve knižnice s rovnakým indexovacím primérom.
4. Preneste 10 µl každej normalizovanej knižnice DNA z platničky NL do skúmavky PDL. Nezdužujte dve knižnice s rovnakým indexovacím primérom.
5. Na platničku NL PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Riadne utesnite okraje a jamky.
6. Premiešajte obsah skúmaviek PRL a PDL vo vortexe.
7. Krátko odstred'te skúmavky PRL a PDL.
8. Inkubujte skúmavky PRL a PDL v ohrievacom bloku pri teplote 96 °C po dobu 2 minút.
9. Skúmavky PRL a PDL uchováajte v chlade 5 minút.
10. Premiešajte skúmavky PRL a PDL vo vortexe a potom krátko odstred'te.
11. Skúmavky PRL a PDL uchováajte v chlade.

Príprava prvého roztoku

1. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako DIL1 (roztok 1).
2. Preneste 20 µl PDL do prázdnej skúmavky DIL1.
3. Pridajte 5 µl PRL do skúmavky DIL1.
4. Skúmavky PDL a PRL zlikvidujte.
5. Pridajte 475 µl vopred schladeného produktu HT1 do skúmavky DIL1 (roztok v pomere 1 : 20).

6. Premiešajte skúmavku DIL1 vo vortexe a potom krátko odstred'te.

Príprava druhého roztoku

1. Označte 2,0 ml skúmavku do mikroodstredivky ako DIL2 (roztok 2).
2. Preneste 40 µl DIL1 do prázdnej skúmavky DIL2.
3. Skúmavku DIL1 zlikvidujte.
4. Pridajte 1660 µl vopred schladeného produktu HT1 do skúmavky DIL2 (roztok v pomere 1 : 850).
5. Premiešajte 20 pM dPhiX vo vortexe a potom krátko odstred'te.
6. Pridajte 2,5 µl pripraveného produktu 20 pM dPhiX do skúmavky DIL2.
7. Premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
8. Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazenej kazety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov).
Ďalšie informácie nájdete v dokumente *Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.
9. Skúmavku DIL2 zlikvidujte.
10. Odstred'ujte platničku NL PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty a uskladnite pri teplote -25 °C až -15 °C na max. 32 dní.
11. Pokračujte sekvenovaním.
Ďalšie informácie nájdete v dokumente *Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Možnosť 2: Iba knižnice DNA

1. Označte skúmavku do mikroodstredivky ako PDL (združené knižnice DNA).
2. Preneste 10 µl každej normalizovanej knižnice DNA z platničky NL do skúmavky PDL.
Nezdružujte dve knižnice s rovnakým indexovacím primérom.
3. Na platničku NL PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Riadne utesnite okraje a jamky.
4. Premiešajte skúmavku PDL vo vortexe a potom krátko odstred'te.
5. Inkubujte skúmavku PDL v ohrievacom bloku pri teplote 96 °C po dobu 2 minút.
6. Skúmavku PDL uchováajte v chlade 5 minút.
7. Premiešajte skúmavku PDL vo vortexe a potom krátko odstred'te.
8. Skúmavku PDL uchováajte v chlade.

Príprava prvého roztoku

1. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako DIL1 (roztok 1).
2. Preneste 10 µl PDL do prázdnej skúmavky DIL1.
3. Skúmavku PDL zlikvidujte.
4. Pridajte 190 µl vopred schladeného produktu HT1 do skúmavky DIL1 (roztok v pomere 1 : 20).
5. Premiešajte DIL1 vo vortexe a potom krátko odstred'te.

Príprava druhého roztoku

1. Označte 2,0 ml skúmavku do mikroadstredivky ako DIL2 (roztok 2).
2. Preneste 40 µl DIL1 do prázdnej skúmavky DIL2.
3. Skúmavku DIL1 zlikvidujte.
4. Pridajte 1660 µl vopred schladeného produktu HT1 do skúmavky DIL2 (roztok v pomere 1 : 850).
5. Premiešajte 20 pM dPhiX vo vortexe a potom krátko odstred'te.
6. Pridajte 2,5 µl pripraveného produktu 20 pM dPhiX do skúmavky DIL2.
7. Premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
8. Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazenej kazety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov).
Ďalšie informácie nájdete v dokumente *Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.
9. Skúmavku DIL2 zlikvidujte.
10. Odstred'ujte platničku NL PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty a uskladnite pri teplote -25 °C až -15 °C na max. 32 dní.
11. Pokračujte sekvenovaním.
Ďalšie informácie nájdete v dokumente *Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Možnosť 3: Iba knižnice RNA

1. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako PRL (združené knižnice RNA).
2. Preneste 10 µl každej normalizovanej knižnice RNA (cDNA) z platničky NL do skúmavky PRL.
Nezdružujte dve knižnice s rovnakým indexovacím primérom.
3. Na platničku NL PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
4. Obsah skúmavky PRL premiešajte vo vortexe.
5. Skúmavku PRL krátko odstred'te.
6. Inkubujte skúmavku PRL v ohrievacom bloku pri teplote 96 °C po dobu 2 minút.
7. Skúmavku PRL uchováajte v chlade 5 minút.

8. Premiešajte skúmavku PRL vo vortexe a potom krátko odstred'te.
9. Skúmavku PRL uchovávajte v chlade.

Príprava prvého roztoku

1. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako DIL1 (roztok 1).
2. Preneste 10 µl PRL do prázdnej skúmavky DIL1.
3. Skúmavku PRL zlikvidujte.
4. Pridajte 190 µl vopred schladeného produktu HT1 do skúmavky DIL1 (roztok v pomere 1 : 20).
5. Premiešajte DIL1 vo vortexe a potom krátko odstred'te.

Príprava druhého roztoku

1. Označte 2,0 ml skúmavku do mikroadstredivky ako DIL2 (roztok 2).
2. Preneste 40 µl DIL1 do prázdnej skúmavky DIL2.
3. Skúmavku DIL1 zlikvidujte.
4. Pridajte 1646 µl vopred schladeného produktu HT1 do skúmavky DIL2 (roztok v pomere 1 : 843).
5. Premiešajte 20 pM dPhiX vo vortexe a potom krátko odstred'te.
6. Pridajte 16,7 µl pripraveného produktu 20 pM dPhiX do skúmavky DIL2.
7. Premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.
8. Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazenej kazety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov).
Ďalšie informácie nájdete v dokumente *Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.
9. Skúmavku DIL2 zlikvidujte.
10. Odstred'ujte platničku NL PCR pri otáčkach 280 × g po dobu 1 minúty a uskladnite pri teplote -25 °C až -15 °C na max. 32 dní.
11. Pokračujte sekvenovaním.
Ďalšie informácie nájdete v dokumente *Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Interpretácia výsledkov

Výsledky sekvenovania z analýzy TSO Comprehensive (EU) sa vykazujú pre každú vzorku samostatne v správe PDF a správe JSON. Na úrovni vzorky sa taktiež generuje správa Low Depth Report (`LowDepthReport.tsv`).

Na úrovni chodu sa generujú nasledujúce výstupné súbory:

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

V správach PDF a JSON sú uvedené iba varianty, ktoré úspešne absolvujú kontrolu kvality.

Podrobné informácie o analýze nájdete v časti *Príručka k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661).

Pridružené diagnostické výsledky

Pre každý účel určenia pridruženej diagnostiky (CDx) existujú tri možné výsledky:

- **Pozitívne** – deteguje sa variant alebo biomarker a je klasifikovaný na úrovni 1 (CDx).
- **Bez detekcie** – vo vzorke nie sú detegované žiadne varianty ani biomarkery súvisiace s účelom určenia CDx. Vybratý typ tumoru pre vzorku je vhodný pre CDx.
- **Bez výsledku** – určenie stavu variantu nie je možné, a to najmenej z jedného nasledujúceho dôvodu:
 - Účel určenia CDx nie je vhodný pre testovanú vzorku, pretože typ vybratého tumoru pre vzorku je nevhodný z hľadiska typu tumoru pri diagnostike CDx.
 - Chod sekvenovania nesplnil špecifikácie kontroly kvality.
 - Knižnica nesplnila požadované špecifikácie kontroly kvality.
 - Príslušná nukleová kyselina sa nespracovala.

Výsledky všetkých účelov určenia diagnostiky CDx sú uvedené v časti Výsledky pridruženej diagnostiky v správe JSON. Časť Výsledky pridruženej diagnostiky v správe PDF obsahuje iba účely určenia s pozitívnym výsledkom.

Varianty na profilovanie tumoru

Analýza TSO Comprehensive (EU) je navrhnutá tak, aby vykazovala somatické varianty pri vykazovaní variantov s dôkazom klinického významu alebo varianty s potenciálnym klinickým významom. Analytický softvér TSO Comprehensive (EU) využíva databázu KB, ktorá určuje, či je každý detegovaný a spôsobilý variant ([Tabuľka 2](#)) klinicky významný alebo potenciálne klinicky významný na základe dôkazu terapeutických, diagnostických alebo prognostických asociácií. Databáza KB zohľadňuje aj to, či sa stanovili (alebo nestanovili) asociácie pre testovaný typ tumoru. Asociácie náchylnosti alebo rizika rakoviny nie sú zahrnuté do databázy KB. Bežné polymorfizmy sú odstránené.

V prípade variantov na profilovanie tumoru sú pozitívne výsledky klasifikované ako genomické nálezy s dôkazom klinického významu (úroveň 2) alebo genomické nálezy s potenciálnym klinickým významom (úroveň 3), a to podľa inštalovanej databázy KB a identifikovaného typu tumoru.

Zlyhania v oblasti kontroly kvality vedú k nulovým výsledkom pre typy variantov, ktoré sú relevantné vzhľadom na neúspešnú metriku kontroly kvality. Viac informácií nájdete v [Tabuľka 40](#) a [Tabuľka 41](#). Pozície profilovania tumoru s nedostatočnou hĺbkou sú uvedené v správe Low Depth Report – nie v správe TSO Comprehensive (EU).

Kontrola kvality

- Informácie o kvantifikácii nukleovej kyseliny a o minimálnych požiadavkách na vstupný materiál nájdete v časti [Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28](#).
- Validita chodu sekvenovania a vzorky sa určujú automaticky a vykazuje ich analýza Analytický modul TSO Comprehensive (EU). Podrobné informácie o analýze nájdete v časti *Príručke k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661)*.
- Správa TSO Comprehensive (EU), ktorá je k dispozícii vo formátoch PDF a JSON, obsahuje súhrn výsledkov kontroly kvality. Súbor so správou sa nachádzajú v priečinku analýzy. Umiestnenie priečinka analýzy (obsahuje správy vo formáte PDF a JSON) a priečinok chodu nájdete v *Príručke k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661)*.

Tabuľka 40 Metriky kontroly kvality v správe s výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU)

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Popis	Vplyv zlyhania špecifikácie*
Sekvenovací chod	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Percento čítaní, ktoré úspešne prešli filtrom (PF).	Sekvenovací chod je neplatný. V chode nie sú vykazované žiadne výsledky pre žiadnu vzorku.

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Popis	Vplyv zlyhania špecifikácie*
Knižnice DNA	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Priemerné percento primárnych analýz báz so skóre kvality Q30 alebo vyšším pre čítanie 1.	Sekvenovací chod je neplatný. V chode nie sú vykazované žiadne výsledky pre žiadnu vzorku.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Priemerné percento primárnych analýz báz so skóre kvality Q30 alebo vyšším pre čítanie 2.	
	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 ALEBO > 3106 a P_ VALUE ≤ 0,049	Metrika hodnotiaca pravdepodobnosť kontaminácie použitím VAF bežných variantov. Skóre kontaminácie je založené na VAF distribúcii polymorfizmu SNP. Hodnota P kontaminácie sa používa na vyhodnotenie vysoko preusporiadaných genómov. Platí len v prípade, že je skóre kontaminácie vyššie ako horný limit špecifikácie.	Nie sú vykazované žiadne výsledky DNA.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Mediánová dĺžka fragmentu vo vzorke.	Nie sú vykazované žiadne výsledky TMB ani malých variantov DNA.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (počet)	≥ 150	Mediánové pokrytie fragmentu exónu vo všetkých bázach exónu.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Percento exónových báz s 50× pokrytím fragmentu.	

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Popis	Vplyv zlyhania špecifikácie*
	USABLE_MSI_SITES (počet)	≥ 40	Počet lokalít MSI použiteľných na analýzu MSI (počet mikrosatelitných lokalít s dostatočným rozsahom čítaní na identifikáciu mikrosatelitnej nestability).	Nie sú vykazované žiadne výsledky MSI.
	COVERAGE_MAD (počet)	$\leq 0,210$	Medián absolútnych odchýlok od mediánu normalizovaného počtu každej cieľovej oblasti CNV.	Nie sú vykazované žiadne výsledky
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (počet)	$\geq 1,0$	Mediánový nespracovaný binárny počet na cieľ pre CNV.	amplifikácie génu.
Knižnice RNA	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Mediánová dĺžka fragmentu vo vzorke.	Nie sú vykazované žiadne výsledky fúzií ani variantov zostrihu.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeficient)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X je jednotkou uniformity pokrytia. Pre každý gén s pokrytím najmenej 500× sa počíta koeficient variácie v pokrytí tela génu. Táto metrika je mediánom týchto hodnôt. Vysoká hodnota indikuje vysokú úroveň variácie a problém s prípravou knižnice (napríklad nízke množstvo vstupnej vzorky alebo problémy s posunom sondy). Táto metrika sa počíta použitím všetkých čítaní (vrátane čítaní označených ako duplikáty).	

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Popis	Vplyv zlyhania špecifikácie*
	TOTAL_ON_TARGET_READS (počet)	$\geq 9\,000\,000$	Celkový počet čítaní, ktoré sú mapované k cieľovým oblastiam. Táto metrika sa počíta použitím všetkých čítaní (vrátane čítaní označených ako duplikáty).	

* Úspešné výsledky sú označené ako PASS (Úspešné).

Tabuľka 41 TSO Comprehensive (EU) Metriky kontrol v správe s výsledkami analýzy

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Vplyv zlyhania špecifikácie*
Pozitívna kontrola	Externá kontrola DNA	23 z 24 stanovených variantov bolo detegovaných	Manuálne zrušte platnosť vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky. Softvér analytického modulu nevykonáva automatické zrušenie platnosti vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky.
	Externá kontrola RNA	12 z 13 stanovených variantov bolo detegovaných	
Kontrola bez templátu	Mediánové pokrytie exónu DNA pre TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Manuálne zrušte platnosť vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky. Softvér analytického modulu nevykonáva automatické zrušenie platnosti vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky.
	Gén RNA nad hraničnou hodnotou mediánu	≤ 1	

* Úspešné výsledky sú označené ako PASS (Úspešné).

- Opakujte chody sekvenovania, ktoré sú neplatné.
- Opakujte testy knižníc, ktoré mali tieto výsledky:
 - Kontaminované knižnice DNA
 - Neplatné knižnice RNA
 - Testy je možné opakovať na získanie viacerých výsledkov variantu alebo biomarkera pre knižnice DNA, ktorých platnosť bola zrušená pre jeden, ale nie všetky typy variantov.
- Pozitívne kontroly sú hodnotené z hľadiska stanovenia variantu. Ak pozitívne kontroly nespĺňajú špecifikácie stanovenia variantu, manuálne zrušte platnosť chodu sekvenovania. Softvér analytického modulu nevykonáva automatické zrušenie platnosti vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky.

- NTC sú hodnotené z hľadiska mediánového exónového pokrytia pre DNA a gény nad hraničnou hodnotou mediánu pre RNA. Ak negatívne kontroly nespĺňajú špecifikácie, manuálne zrušte platnosť udalosti prípravy knižnice a všetkých súvisiacich chodov sekvenovania. Softvér analytického modulu nevykonáva automatické zrušenie platnosti vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky.
- Vykonajte ďalšie kroky kontroly kvality v súlade s miestnymi, štátnymi a federálnymi nariadeniami alebo regulačnými požiadavkami.

Ďalšie informácie o opakovaní chodov sekvenovania alebo testov knižníc nájdete v časti [Riešenie problémov na strane 87](#).

Riešenie problémov

Pomocou nasledujúcej tabuľky sa môžete pokúsiť vyriešiť prípadné problémy v rámci pracovného postupu. Ak cyklus sekvenovania alebo príprava knižnice na vzorku dvakrát zlyhá, vyžadujú sa ďalšie opatrenia na riešenie problémov. Obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaná akcia
Chod sekvenovania nevyhovuje špecifikáciám kontroly kvality chodu.	- Chyba združovania - Chyba riedenia - Neúplná tepelná denaturácia PRL/PDL - Problémy s prípravou spotrebného materiálu na sekvenovanie (napríklad že nedošlo k dostatočnému rozmrazeniu, kondenzácia/nečistoty na prietokovom článku)	Opakujte sekvenovanie knižníc z platničky normalizovaných knižníc (NL) PCR. Pozrite si časť Príprava na sekvenovanie na strane 75.
	- Nesprávne použitie sond na obohatenie (napríklad sondy OPR1 použité pre vzorky DNA, sondy OPD2 použité pre vzorky RNA) - Chyba v pracovnom postupe prípravy knižnice počas prvého kroku hybridizácie alebo po ňom.	Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Pozrite si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59.
	Požiadavky na vstup/zadanie vzorky neboli splnené	Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Pozrite si časť Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA na strane 45 alebo Fragmentácia gDNA na strane 50 .
	Chyba v pracovnom postupe prípravy knižnice počas kroku indexovania PCR alebo pred ním	Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Pozrite si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59 .

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaná akcia
	Problém s prístrojom	Obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.
Chyba generovania správy alebo všeobecná chyba prístroja (sieťová chyba, chyby počas vkladania/vykladania reagensov atď.)	Problém so softvérom alebo prístrojom.	Pomoc pri vytváraní správ nájdete v dokumente Príručka k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661). Požiadajte o pomoc oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.
Knižnica DNA nespĺňa špecifikácie kontroly kvality.	Požiadavky na vstup/zadanie vzorky neboli splnené.	Zabezpečte vhodný vstup/zadanie vzorky a opakujte prípravu knižnice počnúc krokom fragmentácie gDNA. Pozrite si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28 .
	Chyba používania alebo vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy.	Opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo laboratórneho vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému. • Opakujte sekvenovanie knižníc z platničky normalizovaných knižníc (NL) PCR. Pozrite si časť Príprava na sekvenovanie na strane 75. • Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Pozrite si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Pozrite si časť Fragmentácia gDNA na strane 50.

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaná akcia
	Kritériá CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE nie sú splnené.	Prečítajte si varovania a preventívne opatrenia, v ktorých nájdete informácie o vyhnutí sa krížovej kontaminácii. Skontrolujte usporiadanie platničky a indexáciu knižnice a overte, či knižnice rovnakého indexu neboli spolu sekvenované. V prípade dotknutých knižníc spustíte prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Pozrite si časť Fragmentácia gDNA na strane 50. Počas extrakcie vzorky mohlo dôjsť ku kontaminácii. Pravdepodobne budete musieť opakovať extrakciu a zaistiť, aby vzorka nebola kontaminovaná.
	Použiteľná MSI zlyhala.	Prečítajte si pokyny výrobcu ultrazvukového prístroja týkajúce sa nastavení pri používaní a prevádzke (vrátane hladiny vody a typu skúmaviek). Dbajte na správny vstup/zadanie vzorky do analýzy. Pozrite si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28. Ak je vzorka nadmerne fragmentovaná alebo poškodená, môže sa vyžadovať nová extrakcia vzorky a/alebo opakovanie kroku fragmentácie gDNA.

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaná akcia
	Vzorka je nadmerne fragmentovaná alebo vykazuje poškodenie nukleovej kyseliny, ktoré ovplyvňuje schopnosť generovať dostatočne jedinečné knižnice.	Informácie ohľadom používania a prevádzky (vrátane hladiny vody a typu skúmaviek) nájdete v časti Nastavenia konfigurácie ultrazvukového prístroja na fragmentáciu DNA na strane 23 DNA a v nastaveniach výrobcu ultrazvukového prístroja . Dbajte na správny vstup/zadanie vzorky do analýzy. Pozrite si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28. Ak je vzorka nadmerne fragmentovaná alebo poškodená, môže sa vyžadovať nová extrakcia vzorky a/alebo opakovanie kroku fragmentácie gDNA.
Knižnica RNA nespĺňa špecifikácie kontroly kvality.	Požiadavky na vstup/zadanie vzorky neboli splnené.	Zabezpečte vhodný vstup/zadanie vzorky a opakujte prípravu knižnice počnúc krokom denaturácie a hybridizácie RNA. Pozrite si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28.

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaná akcia
	Chyba používania alebo vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy.	Opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo laboratórneho vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému. • Opakujte sekvenovanie knižníc z platničky normalizovaných knižníc (NL) PCR. Pozrite si časť Príprava na sekvenovanie na strane 75. • Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Pozrite si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Pozrite si časť Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA na strane 45.
	Vzorka môže byť nadmerne fragmentovaná alebo vykazovať poškodenie nukleovej kyseliny, ktoré ovplyvňuje schopnosť generovať dostatočne jedinečné knižnice.	Dbajte na správny vstup/zadanie vzorky. Pozrite si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uskladnenie nukleovej kyseliny na strane 28. Ak je vzorka nadmerne fragmentovaná alebo poškodená, môže sa vyžadovať nová extrakcia vzorky.

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaná akcia
Zlyhanie pozitívnej kontroly (DNA/RNA).	Neboli splnené požiadavky na vstup vzorky týkajúce sa pozitívnej kontroly.	Dbajte na správny vstup/zadanie do analýzy. Skontrolujte rozloženie platničky a overte, či sa správne reagencie (sondy, indexy) nachádzajú v zodpovedajúcich jamkách. Dbajte na to, aby bola pozitívna kontrolná vzorka skladovaná podľa pokynov na štítku. Pokiaľ ide o všetky vzorky, pre ktoré sa používa pozitívna kontrola, opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému. • Opakujte sekvenovanie knižníc z platničky normalizovaných knižníc (NL) PCR. Pozrite si časť Príprava na sekvenovanie na strane 75. • Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Pozrite si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Pozrite si časť Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA na strane 45 alebo Fragmentácia gDNA na strane 50.
	Chyba používania alebo vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy.	
Zlyhanie NTC (DNA/RNA).	Došlo ku krížovej kontaminácii alebo bola kontaminovaná pracovná oblasť.	Informácie o dekontaminácii pracovných oblastí a predchádzaní krížovej kontaminácii nájdete v časti Varovania a preventívne opatrenia. Skontrolujte usporiadanie platničky a indexáciu knižnice a overte, či knižnice rovnakého indexu neboli spolu sekvenované. Opakujte prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu v prípade všetkých knižníc, ktoré zdieľajú kontrolu bez templátu.
	Nesprávna indexácia knižnice.	

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaná akcia
Softvér indikuje, že do chodu sekvenovania neboli zahrnuté pozitívne a/alebo negatívne kontroly.	Nesprávne priradenie typu rakoviny pri plánovaní chodu v aplikácii Local Run Manager.	Opätovne zaradte analýzu do frontu so správne identifikovanými kontrolami podľa pokynov v príručke pracovného postupu modulu analýzy (pozrite si časť <i>Príručky k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)</i> (dokument č. 200008661)).

Výkonnostné charakteristiky

TSO Comprehensive (EU) je cieleň panel NGS detegujúci zmeny v 517 génoch. Malé varianty DNA (jednodukleotidové varianty [SNV], viacnukleotidové varianty [MNV], inzercie a delécie) sú vhodné na vykazovanie zo všetkých 517 génov. Mutačná nálož tumoru je vykazovaná ako skóre na základe počtu somatických variantov na megabázu (hodnotiteľná oblasť), ktoré nepôsobia ako stimulačný faktor (podrobnosti nájdete v dokumente *Príručka k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (dokument č. 200008661)). MSI sa vykazuje ako stav. Amplifikácie génov sú vhodné na vykazovanie z génov MET a ERBB2. Fúzie sú vhodné na vykazovanie z 23 génov uvedených v časti [Súhrn a vysvetlenie analýzy na strane 1](#). Varianty zostrihu sú vhodné na vykazovanie z génov MET a EGFR. Aby ich bolo možné vykazovať, varianty musia byť detegované, musia byť uvedené v databáze KB analýzy TSO Comprehensive (EU) a musia byť vhodné na základe typu testovaného tkaniva. Aby ich bolo možné vykazovať, fúzie NTRK vyžadujú, aby bol partner fúzie 5' a doména NTRK kinázy bola neporušená.

V prípade malých variantov DNA bol použitý reprezentatívny prístup k validácii cieleň génov na paneli, s údajmi reprezentujúcimi SNV, MNV, inzercie a delécie. V prípade amplifikácií génov, fúzií a variantov zostrihu sa testovanie uskutočnilo na úrovni génu. TMB a MSI boli hodnotené tam, kde boli indikované. Pokiaľ ide o predpoklady CDx fúzií NTRK, fúzie vo vzorkách FFPE boli testované v rámci štúdií zameraných na účinnosť špecifickú pre daný predpoklad (napríklad detekčný limit, presnosť v rámci laboratória, reprodukovateľnosť, správnosť a klinická účinnosť).

[Tabuľka 42](#) obsahuje definície metrík počítaných v rôznych štúdiách.

Tabuľka 42 Definície metrík

Výraz	Definícia
Percentuálna zhoda pozitívnych výsledkov (Positive Percent Agreement, PPA)	Percento pozitívnych výsledkov správne identifikovaných z celkového počtu pozitívnych výsledkov v porovnaní s ortogonálnou metódou.

Výraz	Definícia
Percentuálna zhoda negatívnych výsledkov (Negative Percent Agreement, NPA)	Percento negatívnych výsledkov správne identifikovaných z celkového počtu negatívnych výsledkov v porovnaní s ortogonálnou metódou.
Celková percentuálna zhoda (Overall Percentage Agreement, OPA)	Percento pozitívnych a negatívnych výsledkov správne identifikovaných z celkového počtu pozorovaní v porovnaní s ortogonálnou metódou.
Percento pozitívnych stanovení (PPC)	Percento pozorovaní, ktoré dávajú pozitívny výsledok vzhľadom na cieľ, z pozorovaní, u ktorých je vzhľadom na cieľ pozitívny výsledok očakávaný.
Percento negatívnych stanovení (PNC)	Percento pozorovaní, ktoré vykazujú negatívny výsledok vzhľadom na cieľ, z pozorovaní, u ktorých je vzhľadom na cieľ negatívny výsledok očakávaný.
n/N	Počet pozitívnych alebo negatívnych pozorovaní (n) vydelený celkovým počtom pozorovaní (N) na výpočet PPC alebo PNC. Hodnoty n a N môžu byť na rôznych úrovniach (napr. variant alebo gén) alebo kombinované v rámci skupiny (napr. SNV).
Štandardná odchýlka (SD)	Miera variácie hodnôt premennej okolo jej priemeru.
Percento koeficientu variácie (%CV)	Štandardná odchýlka vydelená priemerom ako percento.

Krížová kontaminácia

Uskutočnila sa štúdia krížovej kontaminácie na účely hodnotenia, či môžu byť v dôsledku kontaminácie medzi jamkami počas prípravy knižnice alebo kontaminácie medzi po sebe nasledujúcimi chodmi sekvenovania vykazované falošne pozitívne výsledky. Táto analýza bola vykonaná pre malé varianty DNA (čo tiež ovplyvňuje TMB), fúzie, amplifikácie génov a MSI. Knižnice boli pripravené z charakterizovaných vzoriek v šachovnicovom rozložení so striedajúcimi sa vzorkami na vyhodnotenie kontaminácie medzi jamkami a so striedajúcimi sa indexmi na vyhodnotenie medzi po sebe nasledujúcimi chodmi sekvenovania, keď boli sekvenované postupne v tom istom nástroji Prístroj NextSeq 550Dx. Štúdia krížovej kontaminácie vykazovala nulový podiel udalostí kontaminácie pozorovaných preskúmaním detegovaných variantov v každej vzorke, pričom neboli detegované žiadne falošne pozitívne výsledky.

Pre analýzu TSO Comprehensive (EU) boli na detekciu kontaminácie vzoriek DNA navrhnuté dve metriky kontroly kvality (CONTAMINATION_SCORE a P_VALUE). Bola hodnotená citlivosť detekcie kontaminácie. Vzorky FFPE DNA tumoru boli zmiešané s rôznymi množstvami vzoriek FFPE normálnej DNA na vytvorenie účelovo kontaminovaných vzoriek.

Celkovo bolo vytvorených 1 112 pozorovaní kontaminácie a kontaminácia bola zistená v 95 % (1 054) pozorovaní. Miera detekcie sa zvýšila na 96 % (939/976), keď percento kontaminácie bolo medzi 10 % a 90 % (hmota/hmota). Z 37 pozorovaní medzi 10 % a 90 % kontamináciou tam, kde sa nezistila kontaminácia, 12 nespĺnilo špecifikáciu krytia na stanovenie malých variantov DNA. Nízke pokrytie bráni detekcii kontaminácie, ale malé varianty DNA nie sú vykazované, čo zmierňuje akýkoľvek účinok kontaminácie. Pätnásť pozorovaní nespĺnilo špecifikáciu amplifikácie génu (metrika kontroly kvality mediánového binárneho počtu) na stanovenie amplifikácie génov. Pre vzorky nebol vykazovaný žiadny výsledok amplifikácie génov.

Štúdia preukázala, že analýza TSO Comprehensive (EU) bude mať nízky výskyt krížovej kontaminácie medzi jamkami alebo chodmi. Tieto výsledky spolu s metrikami kontaminácie v softvéri zmierňujú riziko výsledkov s falošnými variantmi v dôsledku kontaminácie vzorky.

Hodnotenie súpravy na extrakciu nukleovej kyseliny

Tri komerčne dostupné súpravy na extrakciu DNA a RNA boli hodnotené pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU). Uvedené tri extrakčné súpravy izolovali DNA a RNA z rovnakých sekcií tkaniva FFPE. Súpravy sa odlišovali látkou na deparafinizáciu a krokmi viazania nukleovej kyseliny ([Tabuľka 43](#)). Súprava 1 bola hlavnou extrakčnou súpravou použitou na stanovenie účinnosti analýzy TSO Comprehensive (EU).

Tabuľka 43 Charakteristiky súpravy

Súprava	Látka na deparafinizáciu	Viazanie nukleovej kyseliny
1	Vlastná	Stípec
2	Xylén	Stípec
3	Minerálny olej	Magnetické guľôčky

[Tabuľka 44](#) a [Tabuľka 45](#) obsahujú súhrn vplyvov extrakčných súprav na platnosť knižnice a stanovenie variantov. Ak boli stredné hodnoty extrakčnej súpravy významne odlišné, bol vykazovaný rozdiel. Stredné hodnoty rozdielov medzi extrakčnými súpravami boli počítané so súpravou 1 ako kontrolou, pretože súprava 1 bola použitá na extrakciu väčšiny nukleových kyselín použitých na analytické štúdie TSO Comprehensive (EU). Stredná hodnota rozdielu v porovnaní so súpravou 1 ilustrovala, ako by rôzne extrakčné súpravy ovplyvnili iné analytické štúdie TSO Comprehensive (EU).

Tabuľka 44 Vplyvy extrakčnej súpravy na platnosť knižnice

Typ variantu	Metrika kontroly kvality knižnice	Stredná hodnota rozdielu v porovnaní so súpravou 1
Malé varianty DNA/TMB	Mediánové exónové pokrytie (počet) PCT Exon 50X (%) Stredná hodnota veľkosti vložky (bp)	Súprava 2 nižšia o 56 čítaní Súprava 3 vyššia o 0,298 % Súprava 2 a súprava 3 nižšie o 3 bp
DNA MSI	Použiteľné lokality MSI	Súprava 3 vyššia o 8 lokalít
Amplifikácia génov DNA	Pokrytie MAD (počet) Mediánový binárny počet	Súprava 2 nižšia o 0,0043 Súprava 2 nižšia o 0,5825, súprava 3 vyššia o 0,3086
RNA (fúzie/varianty zostrihu)	Stredná hodnota veľkosti vložky (bp) Protokol (Median CV Gene500X) Celkový počet pri cieľových čítaniach	Súprava 3 vyššia o 2 bp Súprava 2 vyššia o 0,029 Žiadny významný rozdiel

Extrakčná súprava 2 a súprava 3 mali zvýšené podporné čítania, takže fúzie a varianty zostrihu v blízkosti LoD majú vyššiu pravdepodobnosť detekcie v dôsledku výberu extrakčnej súpravy.

Tabuľka 45 Vplyvy extrakčnej súpravy na stanovenie variantu

Typ variantu (jednotky)	Stanovenie variantov (rozdiel stredných hodnôt vzhľadom na súpravu 1)
Malé varianty DNA (VAF)	Technicky nevýznamné Cieľené varianty: variancia medzi súpravami bola malá v porovnaní s reziduom Necieľené varianty: Žiadne významné rozdiely pri prvých dvoch binoch VAF. Žiadne významné rozdiely pri pozorovaní štatistickej významnosti.
TMB (mutácia na megabázu)	Technicky nevýznamné, variancia medzi súpravami bola malá vzhľadom na reziduom
MSI (% nestabilných lokalít)	Súprava 3 nižšia o 1,9 % nestabilných lokalít
Amplifikácia génov (násobná zmena)	Súprava 2 (0,06) a súprava 3 (0,08) vyššia násobná zmena
Fúzie (podporné čítania)	Súprava 2 mala 51 % nárast a súprava 3 mala 23 % nárast v podporných čítaniach
Varianty zostrihu (podporné čítania)	Súprava 2 a súprava 3 mali 48 % nárast v podporných čítaniach

Interferujúce látky

Bol vyhodnotený vplyv potenciálnych endogénnych a exogénnych látok na účinnosť analýzy TSO Comprehensive (EU). Endogénne látky (melanín a hemoglobín) boli naočkované do vzoriek počas procesu extrakcie nukleovej kyseliny. Exogénne látky (etanol, xylén a proteináza K) boli prítomné počas procesu extrakcie nukleovej kyseliny a boli naočkované aj do purifikovanej nukleovej kyseliny pred prípravou knižnice. Tam, kde bola pozorovaná interferencia s naočkovanou proteinázou K, boli tiež hodnotené zvýšené koncentrácie proteinázy K počas procesu extrakcie. Počas prípravy knižnice boli pridané nadbytočné indexové priméry (15 % a 30 %). Do vzoriek FFPE z tkanív mozgu, prsníka, hrubého čreva, pľúc, medulárnej štítnej žľazy, NSCLC, vaječníkov, prostaty, slín, kože, mäkkého tkaniva a tkaniva štítnej žľazy boli okrem indexovacích primárov pridané látky – na analýzu DNA bolo extrahovaných osem vzoriek a na analýzu RNA bolo extrahovaných 13. Pri indexovaniach primerov sa na analýzu RNA použilo šesť vzoriek FFPE z troch rôznych typov tkanív (štítka žľaza, močový mechúr, hrubé črevo) a päť vzoriek FFPE zo štyroch rôznych typov tkanív (pľúca, štítka žľaza, hrubé črevo, prsník). Pre každú zo 16 jedinečných vzoriek existovala nenačkovaná endogénna kontrola a exogénna kontrola naočkovaná puфом alebo vodou. Vplyv nekrózy bol hodnotený na odlišnom súbore ôsmich vzoriek FFPE z tkanív mozgu, hrubého čreva a pľúc. Pre každú nekrotickú vzorku existovala makrodisekovaná kontrola bez podielu nekrózy. V prípade všetkých interferujúcich látok boli analýzou TSO Comprehensive (EU) testované štyri replikáty na jednu vzorku a jednu látku a porovnané s príslušnou podmienkou kontroly na detekciu malých variantov DNA, amplifikácií génov, fúzií RNA a variantov zostrihu RNA, ako aj na účely určenia stavu MSI a skóre TMB. Zahrnuté boli varianty CDx aj varianty profilovania tumoru.

Detekcia variantov DNA

Melanín (0,2 µg/ml), hemoglobín (2 mg/ml), etanol (5 %), proteináza K (0,04 mg/ml v nukleovej kyseline) ani xylén (0,0001 %) nenarušajú skóre TMB, stav MSI, malé varianty DNA ani amplifikácie génov.

Detekcia variantov RNA

Údaje potvrdzujú nulovú interferenciu melanínu (0,2 µg/ml), etanolu (5 %) a xylénu (0,0001 %) pri fúziách RNA alebo variantoch zostrihu. Hemoglobín (2 mg/ml) interferoval (znížené podporné čítania) s tromi rôznymi variantmi zostrihu v géne MET. Variant zostrihu v géne AR (tri rôzne vzorky) a jeden v géne EGFR (jedna vzorka) neboli ovplyvnené. Ak laboratórium spracováva RNA prostredníctvom analýzy, pri získavaní rezov z tkanivového bloku je potrebné vyhnúť sa tkanivu s hemoglobínom alebo ho minimalizovať.

Proteináza K (0,04 mg/ml v nukleovej kyseline) interferovala s fúziami RNA a variantmi zostrihu. Proteináza K bola testovaná pri 2,6 mg/ml a 5,2 mg/ml počas extrakčného procesu, čo je 2- a 4-násobok štandardnej koncentrácie v komerčne dostupnej súprave. Fúzie boli inhibované pri 4-násobnej koncentrácii, ale nie pri 2-násobnej koncentrácii proteinázy K. Varianty zostrihu boli inhibované pri 2-násobnej koncentrácii proteinázy K. Proteináza K alebo ekvivalentný enzým by počas extrakcie nemali byť zvyšované zo štandardnej koncentrácie poskytnutej v extrakčnej súprave.

Podporné čítania pre varianty zostrihu sa znižujú s 30 % nadbytkom indexových primérov, ale nie s 15 % nadbytkom.

Nekróza

Prítomnosť nekrotického tkaniva až do výšky 70 % nenarúšala skóre TMB, stav MSI, ani detekciu malých variantov DNA. Detekcia variantov RNA (podporné čítania) a amplifikácie génov (násobná zmena) boli znížené vo vzorkách s nekrotickým obsahom v oblasti tkaniva $\geq 25\%$ a $\geq 23\%$ (podľa oblasti). Ak sekcie vzorky obsahujú $\geq 23\%$ nekrózy v celkovej oblasti tkaniva, nekrotické tkanivo je potrebné makrodisekovať.

Stabilita

Stabilita v reálnom čase

Stabilita v reálnom čase bola použitá na stanovenie doby skladovateľnosti súpravy analýzy TSO Comprehensive (EU) v prípade jej skladovania podľa podmienok uvádzaných na označení. Dizajn štúdie bol založený na testovaní troch šarží reagensií a v rámci štúdie bol použitý klasický dizajn štúdie stability uvádzaný v dokumentácii CLSI EP25-A. Súpravy boli uskladnené vo finálnej konfigurácii súpravy po dobu trvania štúdie v podmienkach skladovania uvádzaných na označení produktu. Zmrazené súčasti súpravy boli uskladnené pri teplote $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chladené súčasti súpravy boli uskladnené pri teplote $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Súpravy boli testované z hľadiska vzhľadu a plnenia funkčných požiadaviek v stanovených časových bodoch. Okrem toho boli analyzované stanovenie variantu a trendy metriky kontroly kvality vzorky pre materiál kontroly QC. Pre každú reagensiu bola stanovená doba skladovateľnosti. Dátumy expirácie sú stanovené podľa dátumu výroby a doby skladovateľnosti. Expirácia súpravy je stanovená podľa tej reagensie, ktorej dátum expirácie uplynie ako prvý.

Stabilita súpravy počas používania

Stabilita analytickej súpravy TSO Comprehensive (EU) počas používania bola hodnotená v rámci štandardných podmienok používania v priebehu doby skladovateľnosti s cieľom overiť viaceré použitia súpravy. Súprava reagensií bola viackrát zmrazená a rozmrazená a testovaná z hľadiska až 4 použití súpravy. Okrem toho bolo pripravených 8 knižníc RNA a 8 knižníc DNA, celkom 3-krát, na testovanie maximálneho možného počtu knižníc (24 knižníc DNA a 24 knižníc RNA na jednu súpravu). Všetky funkčné kritériá súpravy boli splnené pre všetky testované cykly zmrazenia a rozmrazenia a časové body. Uskutočnilo sa testovanie vzoriek FFPE s reagensiami starými ≥ 25 mesiacov na účely hodnotenia vplyvu testovania stanovenia variantu počas používania. Kvalitatívna analýza cielených variantov dokazuje, že udalosti počas používania neovplyvňovali stanovenie variantu.

Stabilita nukleových kyselín

Stabilita nukleových kyselín (DNA a RNA) a ich súvisiaca kvantifikácia na použitie s analýzou TSO Comprehensive (EU) bola hodnotená pomocou FFPE vzoriek z viacerých typov tkanív. Bloky FFPE boli rozdelené a všetky nukleové kyseliny boli extrahované naraz. Extrahovaná nukleová kyselina bola dôkladne premiešaná, kvantifikovaná, skontrolovaná z hľadiska kvality nukleovej kyseliny a alikvótne rozdelená do dvoch súprav jednorazových skúmaviek na zmrazenie počas dvoch časových bodov: Kontrola T0 (východisková hodnota) a test T1 (≥ 28 dní). Všetka extrahovaná RNA bola skladovaná pri teplote $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ a všetka

extrahovaná DNA bola skladovaná pri teplote -25 °C až -15 °C po určenú dobu a potom spracovaná prostredníctvom analýzy TSO Comprehensive (EU) v rámci viacerých replikátov a operátorov. Testovacia podmienka T1 bola porovnaná s kontrolou pre stav MSI, skóre TMB, amplifikácie génov, malé varianty DNA, fúzie RNA a varianty zostrihu RNA. Údaje naznačujú, že nukleové kyseliny a ich súvisiaca kvantifikácia na použitie s analýzou TSO Comprehensive (EU) sú stabilné až 28 dní pri skladovaní pri odporúčaných teplotách (RNA pri -85 °C až -65 °C a DNA pri -25 °C až -15 °C).

Stabilita knižníc

Stabilita knižníc využívajúcich každý zo šiestich bezpečných bodov zastavenia pre analýzu (pozrite si [Tabuľka 5](#)) sa hodnotila pomocou vzoriek FFPE z viacerých typov tkanív. Kontrolné knižnice (T0, žiadne body zastavenia) boli sekvenované bezprostredne na konci pracovného postupu. Alikvotné časti z tých istých knižníc boli počas doby (T1) udržiavané v bodoch zastavenia pri teplote -25 °C až -15 °C na podporu dní uvedených v [Tabuľka 5](#). Knižnica T1 bola porovnaná s T0 pre malé varianty DNA, TMB, amplifikácie génov, MSI, fúzie RNA a varianty zostrihu RNA s variantmi CDx a profilovaním tumoru. Údaje naznačujú, že knižnice vytvorené z analýzy TSO Comprehensive (EU) sú stabilné v súlade s návodom na použitie.

Stabilita tkaniva FFPE upevneného na sklíčku

Stabilita tkanív FFPE upevnených na sklíčku na použitie s analýzou TSO Comprehensive (EU) bola hodnotená rozdelením blokov FFPE (5 µm sekcie) z rôznych jedinečných vzoriek upevnených na sklíčkach, po ktorých nasledovalo skladovanie pri izbovej teplote (22 °C) počas 2 časových bodov. RNA bola extrahovaná a skladovaná pri teplote -65 °C až -85 °C a DNA bola extrahovaná a skladovaná pri teplote -15 °C až -25 °C menej ako 1 týždeň pred testovaním. Materiál nukleovej kyseliny bol kvantifikovaný a potom spracovaný prostredníctvom analýzy TSO Comprehensive (EU) do 24 hodín pre každý časový bod. V každom časovom bode sa analýzou TSO Comprehensive (EU) testovalo viacero replikátov a operátorov na vzorku a porovnali sa s časovým bodom T0 pre MSI, TMB, amplifikácie génov, malé varianty DNA, fúzie RNA a varianty zostrihu RNA vrátane variantov CDx a variantov s profilovaním tumoru. Stanovenie variantov bolo vyhodnotené a splnilo všetky akceptačné kritériá, čo naznačuje, že tkanivá FFPE upevnené na sklíčko na použitie s analýzou TSO Comprehensive (EU) sú stabilné pri izbovej teplote po dobu až 4 týždňov (28 dní). Je potrebné poznamenať, že po 4 týždňoch (28 dňoch) bol zistený 10 % pokles frekvencie platnosti kontroly kvality knižnice MSI z dôvodu kombinácie operátora a doby skladovania. Varianty fúzií a zostrihov RNA mali približne 29 % pokles v podporných čítaniach po skladovaní na sklíčkach po dobu 4 týždňov (28 dní).

Stanovenie ochranného pásma vstupnej titrácie nukleovej kyseliny

Vstup nukleovej kyseliny pre analýzu TSO Comprehensive (EU) bol hodnotený testovaním DNA z 33 vzoriek FFPE zahŕňajúcich 17 typov tkanív, na vstupných úrovniach od 10 ng do 500 ng, a testovaním RNA z 5 vzoriek FFPE z 5 typov tkaniva na vstupných úrovniach v rozsahu od 10 ng do 85 ng. Hodnotili sa metriky kontroly kvality knižnice, ktoré záviseli od vzorky. Výsledky DNA preukázali, že metrika kontroly kvality niektorých (nie však všetkých) vzoriek DNA reagovala na vyššiu vstupnú hodnotu nad nominálnou vstupnou hodnotou 40 ng:

- Parameter MEDIAN_INSERT_SIZE nereagoval na vstup s hodnotou nad 30 ng.
- Parameter MEDIAN_EXON_COVERAGE vykazoval pozitívnu koreláciu vzhľadom na zvyšujúcu sa vstupnú hodnotu.
- Hodnota parametra PCT_EXON_50X sa zvyšovala spolu s rastúcou vstupnou hodnotou až do 80 ng.
- Hodnota parametra USABLE_MSI_SITES sa zvyšovala spolu so zvyšujúcou sa vstupnou hodnotou. Niektoré vzorky s menej než 40 použiteľnými lokalitami MSI (USABLE_MSI_SITES) pri hodnote 40 ng spĺňali špecifikácie pri vyšších vstupných hodnotách, vďaka čomu by bolo možné vypočítať skóre MSI.
- Hodnota parametra MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET sa zvyšovala spolu so zvyšujúcou sa vstupnou hodnotou.
- Zvyšujúca sa vstupná hodnota viedla k zvýšeniu hodnoty parametra COVERAGE_MAD smerom k hornému limitu špecifikácie.

Metriky kontroly kvality vzorky RNA sa zvýšili (MEDIAN_INSERT_SIZE a TOTAL_ON_TARGET_READS) alebo znížili (MEDIAN_CV_GENE_500X) z 10 ng na 40 ng, vo všeobecnosti sa však vo vstupnom rozsahu 40 ng až 85 ng nemenili.

Limit blanku

Percento falošne pozitívnych výsledkov (spomedzi celkového počtu očakávaných negatívnych výsledkov) bolo hodnotené opakovaným testovaním normálneho alebo benígneho tkaniva FFPE, susediaceho tkaniva, ktoré by nemalo obsahovať somatické varianty pre malé varianty DNA, amplifikácie génov, MSI, fúzie RNA a varianty zostrihu RNA. Falošne pozitívne výsledky neboli hodnotené z hľadiska TMB, keďže v takomto prípade neexistuje žiadna klinická hraničná hodnota. Šesť vzoriek DNA a 6 vzoriek RNA FFPE bolo duplicitne analyzovaných 2 operátormi počas 3 dní pre každú z 2 šarží reagencií. Podmnožina vzoriek bola opätovne združená a opätovne sekvenovaná vo formáte „3× len DNA“ a „3× len RNA“ na účely hodnotenia falošne pozitívnych výsledkov v rámci niekoľkých multiplexných konfigurácií, ktoré dokáže toto zariadenie spracovať. Okrem toho bolo analyzovaných 30 ďalších vzoriek RNA v duplikátoch, ktoré boli spracované 1 šaržou reagentu, rozdelené medzi 2 operátorov. Celkom existovalo 168 možných pozorovaní pre DNA a 228 možných pozorovaní pre RNA, hodnota bola znížená o neplatné knižnice pre každý typ variantu. Percento falošne pozitívnych výsledkov bolo v prípade amplifikácií počítané na úrovni génu a v prípade malých variantov DNA na úrovni pozície (približne 1,9 mil. pozícií). Percento falošne pozitívnych výsledkov pre typy variantov DNA je uvedené v [Tabuľka 46](#). TSO Comprehensive (EU) neuvádza žiadne tvrdenia pre CDx (úroveň 1) pre malé varianty DNA, preto pre úroveň 1 nemôžu byť vykazované žiadne falošne pozitívne výsledky pre malé varianty DNA. 271 falošných pozitívnych výsledkov bolo zaradených do úrovni v databáze Knowledge Base pre TSO Comprehensive (EU). Žiadne falošne pozitívne výsledky neboli klinicky významné (2. úroveň). Zo 168 pozorovaní boli 4 falošne pozitívne výsledky na 3. úrovni vyplývajúce z 2 variantov v 4 (2,4 %) pozorovaniach. Percento falošne pozitívnych výsledkov pre fúzie RNA a varianty zostrihu dosahovalo hodnotu 0 %, ako uvádza [Tabuľka 47](#).

Tabuľka 46 Falošne pozitívne výsledky pre typ variantu DNA

Typ variantu	Falošne pozitívne
Amplifikácie génov	0 % (0/9912)
Malé varianty DNA	0,0001 % (271/295 801 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Nevzťahuje sa*

* Falošne pozitívne výsledky nie je možné použiť, pretože TMB sa vykazuje ako skóre a nemá kvalitatívny výsledok.

Tabuľka 47 Falošne pozitívne výsledky pre typ variantu RNA

Typ variantu	Falošne pozitívne
Fúzia	0 % (0/227)
Variant zostrihu	0 % (0/227)

Detekčný limit

Uskutočnili sa dve štúdie na účely hodnotenia detekčných limitov analýzy TSO Comprehensive (EU). Štúdia 1 hodnotila malé varianty DNA RET, fúzie RET a fúzie NTRK1–3. Štúdia 2 hodnotila ďalšie varianty s profilovaním tumoru.

Štúdia 1

Boli stanovené detekčné limity (LoD) NTRK1, NTRK3 a malých variantov RET DNA, ako aj NTRK1–3 a fúzií RET. Limit LoD je najnižšia hodnota analytu (napríklad frekvencia variantnej alely alebo podporné čítania), ktorú je možné konzistentne detegovať (detekčný limit 95 % alebo chyba typu II s hodnotou 5 %). V štúdii boli použité tkanivá FFPE s malými variantmi RET DNA (medulárna rakovina štítnej žľazy), fúziami RET (papilárna rakovina štítnej žľazy, atypický Spitzov tumor) – a fúziami NTRK1–3 (glióm nízkeho stupňa, multiformný glioblastóm, myofibroblastický sarkóm, sarkóm, rakovina prsných vylučovacích žliaz, rakovina hrubého čreva), ako aj bunková línia upravená s FFPE s malými variantmi NTRK1 a NTRK3 DNA. Každá vzorka bola zriedená najmenej na 5 testovacích úrovni (v rozsahu približne 0,01 – 0,10 VAF pre malé varianty DNA a približne 2 –25 podporných čítaní v prípade fúzií). Uskutočnilo sa 18 pozorovaní na každú testovaciu úroveň podľa šarže a variantu, generovaných 3 operátormi a 3 sekvenačnými prístrojmi na prípravu knižnice počas 3 po sebe nenasledujúcich dní s 2 replikátmi na každú úroveň testu vzorky. Uskutočnilo sa testovanie dvoch šarží reagensí.

V prípade variantov DNA sa analyzovali 2 šarže nezávislým spôsobom použitím regresie Probit alebo stanovením miery zhody (najnižšia úroveň testu s mierou zhody (bodový odhad) ≥ 95 %) na určenie limitu LoD pre každý variant podľa šarže. Vyššia hodnota limitu LoD spomedzi dvoch šarží reagensí bola považovaná za limit detekcie variantu ([Tabuľka 48](#)).

V prípade fúzií RNA boli použité bunkové línie FFPE na odhadnutie hodnôt LoD pre každý gén fúzie. Limity LoD boli následne overené pomocou tkanív FFPE použitím duplicitných príprav knižnice 3 operátormi, v 3 prístrojoch a použitím 3 šarží reagencie na generovanie 54 pozorovaní na jeden variant v blízkosti limitu LoD stanoveného bunkovými líniami FFPE. Stanovené limity detekcie pre každú fúziu ([Tabuľka 49](#)) predstavujú najnižšie stredné podporné čítania, ktoré dosiahli mieru zhody (bodový odhad) $\geq 95\%$.

Tabuľka 48 Detekčný limit NTRK1, NTRK3 a malých variantov DNA RET

Marker	Chr ¹	Pozícia	Referencia	Alternatíva	Detekčný limit (frekvencia variantnej alely)
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 (delécia) ²	chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = chromozóm

² Tieto varianty DNA boli analyzované pomocou regresnej analýzy Probit; ďalšie varianty DNA boli analyzované pomocou prístupu miery výskytu.

Tabuľka 49 Detekčný limit pre fúzie NTRK a RET

Gén	Fúzia	Detekčný limit (podporné čítania)
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

Gén	Fúzia	Detekčný limit (podporné čítania)
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Štúdia 2

Uskutočnilo sa hodnotenie detekčných limitov (LoD) variantov s profilovaním tumoru vykazovaných analýzou TSO Comprehensive (EU). Limit LoD je najnižšia hodnota analytu (frekvencia variantnej alely, násobná zmena alebo podporné čítania), ktorú je možné konzistentne detegovať (miera zhody 95 % alebo chyba typu II s hodnotou 5 %). Vzorky FFPE zo 17 typov tkaniva obsahujúce varianty boli zriedené na rôzne testovacie úrovne. Bolo generovaných šesť pozorovaní na jednu úroveň dvomi operátormi a každý z nich používal odlišnú šaržu reagentov a prístroj.

Varianty DNA

Určili sa detekčné limity LoD 10 malých variantov DNA (celkovo 25 variantov) a 2 génové amplifikácie DNA (ERBB2 a MET) a sumarizovali ako rozsahy ([Tabuľka 50](#)). Zahrnuté boli aj varianty RET z LoD štúdie 1. Dve z 3 inzercií, ktorých veľkosť presiahla 5 bp, mali hodnotu LoD 0,034 a 0,036 VAF, tretia dosiahla hodnotu LoD 0,215 VAF. Posledná zo spomínaných bola inzerciou v oblasti s nízkou komplexnosťou, v ktorej inzercia pridá ďalšie opakovania, ovplyvní zarovnávanie a vyžaduje vytvorenie viacerých čítaní, aby bolo výsledkom konzistentné detegovanie. Vzhľadom na to môžu niektoré genomické kontexty s nízkou komplexnosťou ovplyvňovať detegovanie inzercií s veľkosťou > 5 bp.

Tabuľka 50 Detekčný limit malých variantov DNA a amplifikácií génov

Typ (merná jednotka LoD)	Trieda variantu/genomický kontext	Počet variantov	Rozsah (VAF)
Malé varianty DNA (frekvencia variantnej alely)	SNV	5	0,016 – 0,064
	MNV	3	0,022 – 0,048
	Inzercia (1 – 2 bp) v blízkosti homopolymérových opakovaní	2	0,086 – 0,104
	Inzercia (1 – 2 bp) v blízkosti dinukleotidových opakovaní	2	0,038 – 0,051
	Inzercia (3 – 5 bp)	2	0,030 – 0,056
	Inzercia (> 5 bp a až do 25 bp)	3	0,034 – 0,215
	Delécia (1 – 2 bp) v blízkosti homopolymérových opakovaní	2	0,094 – 0,100
	Delécia (1 – 2 bp) v blízkosti dinukleotidových opakovaní	2	0,033 – 0,070
	Delécia (3 – 5 bp)	2	0,028 – 0,064
	Delécia (> 5 bp a až do 25 bp)	2	0,047 – 0,055
Amplifikácia génov (násobná zmena)	Podľa génu (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analýza necielených variantov bola vykonaná zo vzoriek štúdie 1, ktoré mali aspoň päť testovacích úrovní. Každý necielený variant bol analyzovaný individuálne a limit LoD bol odhadnutý iba pre varianty s aspoň jednou úrovňou > 0 % a ≤ 95 % miery úspešnosti a aspoň jednou úrovňou ≥ 95 % miery úspešnosti. [Tabuľka 51](#) zobrazuje percentily spolu s minimálnymi a maximálnymi limitmi LoD pozorovanými podľa triedy pre necielené varianty. Necielené varianty poskytujú viac variantov podľa triedy, ako bolo testované v štúdii 2, a sú konzistentné s rozsahmi LoD z [Tabuľka 50](#).

Tabuľka 51 Súhrnná štatistika pre limity detekcie podľa triedy necielených variantov (zo štúdie 1)

Trieda	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
Inzercia	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Delécia	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Fúzie

Limity LoD boli stanovené pre 19 fúzií zahŕňajúcich 20 génov na paneli TSO Comprehensive (EU), ktorých rozsah podporných čítaní dosahoval 9 až 31,3 (Tabuľka 52). Ďalšie 3 gény (NTRK1–3) boli testované v inej štúdii. Gén RET bol testovaný v rámci tejto štúdie aj v druhej štúdii. Šestnásť fúzií so stanoveným limitom LoD vykazovalo údaje konzistentné s bežným limitom LoD 16 podporných čítaní použitím obojstranného horného limitu spoľahlivosti 95 % (UCL). Dve fúzie vykazovali limit LoD s hodnotami 24,7 a 31,3 podporného čítania, ktoré neboli konzistentné s bežným limitom LoD.

Fúzia FGFR2-SRPK2 s hodnotou LoD 24,7 podporného čítania vykazovala podľa anotácií analytického softvéru TSO Comprehensive (EU) opakované prekrývajúce sa oblasti v bode zlomu. Opakované oblasti v rámci bodu zlomu majú obvykle nižšie úrovne evidencie, keďže čítania sa môžu mapovať kdekoľvek v genóme alebo môžu ostať nezarovnané. Oblasť opakovania okrem toho zvyšujú náročnosť spracovania zostavy (používanej na identifikáciu sekvencií fúzie) a vyžadujú ďalšie dôkazy na vytvorenie správnej sekvencie. SEPT14-EGFR je ďalším príkladom fúzie s homológnu sekvenciou v bode zlomu.

Fúzia BCL2-IGHJ5 s hodnotou LoD z 31,3 podporných čítaní vykazovala veľmi krátky gén (IGHJ5) s bodom zlomu v blízkosti začiatku exónu, v dôsledku čoho sa vyžadovali prerušené krátke zarovnania. Výsledkom bol vyšší požadovaný počet čítaní na dosiahnutie konzistentnej detekcie.

Tabuľka 52 Detekčný limit fúzií

Fúzia	Bod zlomu génu A	Bod zlomu génu B	LoD	Bežný limit LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	áno
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	áno
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	áno
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	áno
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	áno
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	áno
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	áno
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	áno
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	áno

Fúzia	Bod zlomu génu A	Bod zlomu génu B	LoD	Bežný limit LoD
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	áno
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nie
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	áno
CD74-ROS1; GOPC	149784243	117645578	9,2	áno
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	áno
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	áno
DHX8; ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	áno
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	áno
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	nie
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	áno

Variety zostrihu

Dva variety zostrihu RNA – MET a EGFR – vykazovali limit LoD s hodnotou 18,7 a 16,7 podporných čítaní (podľa poradia).

Obsah tumoru

Výsledky štúdie obsahujú odporúčania týkajúce sa obsahu tumoru v klinických vzorkách. Vo všeobecnosti platí, že čím je vyšší obsah tumoru, tým je vyšší signál (VAF, násobná zmena alebo podporné čítania) pre variety v tumore. Minimálne odporúčania týkajúce sa obsahu tumoru vychádzajú z nasledujúcich pozorovaní. Hodnoty limitu LoD pre malé variety DNA dosahujú max. hodnotu 0,104 VAF (s výnimkou inzercie TP53). S cieľom detegovať mutácie, ktoré pôsobia ako faktor stimulujúci vznik tumoru (frekvencia variantnej alely 0,50), sa odporúča 20 % obsah tumoru, aby tieto mutácie dosiahli 0,10 hodnotu VAF a nachádzali sa na úrovni limitu LoD alebo nad ňou. V prípade 20 % obsahu tumoru budú tie gény, ktoré sú amplifikované na 5,5-násobnú zmenu (11 kópií), konzistentne detegované na základe detekčného limitu 1,8-násobnej zmeny. V prípade 20 % obsahu tumoru budú fúzie so 74 podpornými čítaniami konzistentne detegované na základe detekčného limitu 14,7 podporných čítaní.

Reprodukovateľnosť

Uskutočnili sa dve štúdie zamerané na hodnotenie reprodukovateľnosti pre analýzu TSO Comprehensive (EU). Štúdia 1 hodnotila malé variety RET DNA, ako aj variety fúzie NTRK a RET. Štúdia 2 hodnotila ďalšie variety s profilovaním tumoru.

Štúdia 1

Táto štúdia sa uskutočnila na účely hodnotenia reprodukovateľnosti analýzy TSO Comprehensive (EU) v 3 testovacích lokalitách (1 interná, 2 externé) s 2 operátormi na lokalitu, 2 replikátmi v rámci chodu a počas 3 po sebe nenasledujúcich testovacích dní. Testovanie sa uskutočnilo použitím panela reprodukovateľnosti obsahujúceho vzorky DNA so špecifickými známymi malými variantmi RET DNA a vzorky RNA obsahujúce špecifické známe varianty fúzií NTRK1–3 a RET z tkanivových vzoriek fixovaných vo formalíne a zaliatych v parafíne (FFPE), ako aj bunkových línií. Tento panel obsahoval členy panela DNA a RNA s variantami na nízkej a vysokej úrovni s rovnakým počtom členov panela na nízkej a vysokej úrovni pre každú triedu variantu. Členy panela na vysokej úrovni boli cieľené pri približne 2- až 3-násobku limitu LoD, a členy panela na nízkej úrovni boli cieľené približne na úrovni limitu LoD. V každej lokalite každý operátor testoval členy panela duplicitne 3-krát, výsledkom bolo 6 pozorovaní na cieľ a člen panela. Zo všetkých 3 lokalít bolo generovaných 36 pozorovaní na člen panela (3 lokality/prístroje × 2 operátori × 2 replikáty v rámci chodu × 3 dni spustenia).

PPC a PNC cieľených malých variantov DNA a cieľených variantov fúzií RNA na vysokej úrovni boli určené ako primárne výstupy. PPC a PNC cieľených malých variantov DNA a cieľených variantov fúzií RNA na nízkej úrovni boli počítané ako sekundárne výstupy. Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti (CI) súvisiace so všetkými výstupmi boli počítané pomocou metódy Wilsonovho skóre. Uskutočnili sa primárne analýzy na účely odhadnutia PPC a PNC (s priradenými intervalmi CI 95 %) v cieľených členoch panela na vysokej úrovni formou kombinácie pozorovaní analýzy TSO Comprehensive (EU) daného cieľa v skupine členov panela predstavujúcich príslušnú triedu variantu (napríklad malé varianty DNA a fúzie RNA) v rámci lokalít/prístrojov, operátorov a chodov. Pre každý cieľený variant sa do vypočítanej hodnoty PNC začlenili pozorovania analýzy TSO Comprehensive (EU) v iných členoch panela na vysokej úrovni, pre ktoré sa zisťoval rovnaký typ variantu, ale bez obsahu rovnakého variantu, ktorý stanovuje pravidlo väčšiny. Celkové hodnoty PPC a PNC pre cieľené členy panela na nízkej úrovni boli stanovené podobným spôsobom.

Malé varianty RET DNA

Pokiaľ ide o členy panela malých variantov DNA na vysokej úrovni, celková hodnota PPC dosiahla 100,0 % (207/207; 95 % interval CI: 98,2 % až 100,0 %) ([Tabuľka 53](#)). Celková hodnota PNC členov panela malých variantov DNA na vysokej úrovni dosiahla 100,0 % (1035/1035; 95 % interval CI: 99,6 % až 100,0 %) ([Tabuľka 54](#)). Pokiaľ ide o cieľené členy panela malých variantov DNA na nízkej úrovni, celková hodnota PPC pre cieľené členy panela malých variantov DNA na nízkej úrovni dosiahla 99,1 % (210/212; 95 % interval CI: 96,6 % až 99,7 %) a celková hodnota PNC dosiahla 100,0 % (1026/1026; 95 % interval CI: 99,6 % až 100,0 %).

Tabuľka 53 Hodnota PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu malých variantov RET DNA v cielených členoch panela na vysokej a nízkej úrovni

Úroveň variantu	Typ variantu	Cielený variant (nukleotid)	Cielený variant (aminokyselina)	N	Stredná hodnota VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95 % interval CI ²
~2 – 3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Delécia	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Inzercia	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Všetky malé varianty DNA – vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	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)
	Delécia	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Inzercia	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Všetky malé varianty DNA – nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	212	N/A ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Skratky: N/A – nevzťahuje sa; VAF – frekvencia variantnej alely.

² Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 54 Hodnota PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu malých variantov RET DNA v cielených členoch panela na vysokej a nízkej úrovni

Úroveň variantu	Typ variantu	Cielený variant (nukleotid)	Cielený variant (aminokyselina)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % interval CI ²
~2 – 3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Delécia	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Inzercia	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Všetky malé varianty DNA – vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	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)
	Delécia	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Inzercia	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Všetky malé varianty DNA – nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Všetky pozorovania združené z kombinácií variantov a členov panela, pri ktorých je väčšina stanovení negatívna (cielené varianty obsahujúce fúzie s menej než 50 % pozitívnych stanovení).

² Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 55 uvádza analýzu komponentov variancie frekvencií variantných alel (VAF) v rámci približne 36 pozorovaní každého člena panela. Štandardná odchýlka (SD) a percentuálny koeficient variácie (% CV; celkom a pre každý zdroj) boli počítané a prezentované pre každý cielený malý variant RET DNA.

Tabuľka 55 Analýza komponentov variancie analýzy TSO Comprehensive (EU) VAF v cielených členoch panela malých variantov DNA

Úroveň variantu	Typ variantu	Cielený variant (nukleotid)	Cielený variant (Aminokyselina)	N	Stredná hodnota VAF	SD lokality (% CV)	SD operátora (% CV)	SD dňa (% CV)	SD replikátu (% CV)	Celková SD (% CV)
~2 – 3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Delécia	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)
	Inzercia	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)
	Delécia	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)
	Inzercia	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)

Fúzie NTRK 1–3 a RET

V prípade členov panela fúzií RNA na vysokej úrovni bola celková hodnota PPC 99,3 % (285/287; 95 % interval CI: 97,5 % až 99,8 %) (Tabuľka 56). Hodnota PPC bola 100 % pre všetky členy panela na vysokej úrovni okrem člena panela BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % interval CI: 81,9 % až 98,5 %]). Celková hodnota PNC pre členy panela fúzií RNA vysokej úrovne dosiahla 100,0 % (1724/1724; 95 % interval CI: 99,8 % až 100,0 %) (Tabuľka 57). Pokiaľ ide o cielečné členy panela fúzií RNA na nízkej úrovni, celková hodnota PPC bola 95,4 % (272/285; 95 % interval CI: 92,3 %, 97,3 %) a celková hodnota PNC bola 100,0 % (1851/1851; 95 % interval CI: 99,8 % až 100,0 %).

Tabuľka 56 Hodnota PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu fúzií NTRK a RET v cielečných členoch panela s vysokou a nízkou úrovňou

Úroveň variantu	Cielená fúzia	N	Stredná hodnota podporných čítaní	PPC (%) (n/N)	95 % interval CI*
~2 – 3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Všetky fúzie vysoké	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)
	Všetky fúzie nízke	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti (CI) vypočítané pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 57 Hodnota PNC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu fúzií NTRK a RET v necielených členoch panela s vysokou a nízkou úrovňou

Úroveň variantu	Cielené fúzie	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % interval CI ²
~2 – 3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Všetky fúzie – vysoké	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)
	Všetky fúzie – nízke	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Všetky pozorovania združené z kombinácií variantov a členov panela, pri ktorých je väčšina stanovení negatívna (cielené varianty obsahujúce fúzie s menej než 50 % pozitívnych stanovení).

² Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 58 uvádza analýzu komponentov variance podporných čítaní v rámci približne 36 pozorovaní v každej cieľenej fúzii. Hodnoty SD a % CV (celkom a za každý zdroj) boli počítané a prezentované pre každú cieľenú fúziu.

Tabuľka 58 Analýza komponentov variance analýzy TSO Comprehensive (EU) podporných čítaní v cieľených členoch panela fúzie RNA

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

Štúdia 2

Uskutočnila sa druhá štúdia na účely hodnotenia reprodukovateľnosti analýzy TSO Comprehensive (EU) v rámci 3 testovacích lokalít (2 externé a 1 interná), pomocou 2 operátorov/prístrojov na lokalitu, 3 jedinečných šarží reagentie, počas 4 testovacích dní (nenasledujúcich po sebe) a 2 chodov sekvenovania na knižnicu vzoriek.

Testovanie sa uskutočnilo pomocou vzoriek extrahovanej DNA a RNA zo 41 vzoriek tkaniva FFPE a 1 bunkového radu FFPE (s 1 tkanivovou vzorkou FFPE a bunkovou líniou FFPE použitou na vytvorenie 2 členov panelu). Išlo o nasledujúce typy tkanivových vzoriek: močový mechúr, kosti, mozog, prsník, hrubé črevo, stredná časť tenkého čreva, obličky, pľúca, vaječník, prostata, pokožka, mäkké tkanivo, žalúdok, štítna žľaza a maternica. Bolo testovaných celkom 44 členov panela vrátane členov panela DNA s malými variantmi DNA (SNV, MNV, inzercie a delécie), amplifikácií génov, rôznych skóre TMB, vysokých skóre MSI a členov panela RNA s fúziami a variantmi zostrihu. Väčšina členov panela vykazovala známe cieľové varianty na úrovniach približne 2- až 3-násobku detekčného limitu špecifického pre variant (približne 2 – 3x LoD).

Limit LoD je koncentrácia analytu, pri ktorej sú pozorované výsledky analýzy pozitívne (detegovaný variant vzhľadom na hraničnú hodnotu analýzy TSO Comprehensive (EU)) $\geq 95\%$ času. Stredné pozorované úrovne variantu boli kategorizované približne na úrovni $< 2 \times \text{LoD}$ (pozorované úrovne variantu pri $< 1,5 \times \text{LoD}$), približne $2 - 3 \times \text{LoD}$ (pozorované úrovne variantu pri $1,5 \times \text{LoD}$ až $3,4 \times \text{LoD}$) a približne $> 3 \times \text{LoD}$ (pozorované úrovne variantu pri $> 3,4 \times \text{LoD}$).

PPC pre malé varianty DNA, amplifikácie génov, varianty s vysokým podielom MSI (MSI-H) a varianty RNA boli počítané formou kombinácie pozorovaní v rámci chodov sekvenovania a lokalít. PNC boli podobným spôsobom počítané pre malé varianty DNA, amplifikácie génov a varianty RNA. Pre každý známy cielený variant boli pozorovania z analýzy TSO Comprehensive (EU) v členoch panela rovnakého typu variantu, ale obsahujúcich odlišné varianty neodvodené z rovnakej zdrojovej vzorky ani nespĺňajúce pravidlo väčšiny pre daný variant ($< 50\%$ stanovení bolo pozitívnych) skombinované v rámci lokalít, operátorov/prístrojov, dní, šarží reagensií a chodov sekvenovania na účely výpočtu PNC. Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti (CI) boli vypočítané pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Malé varianty DNA

Tabuľka 59 uvádza PPC pre cielené malé varianty DNA. Hodnoty PPC dosahovali od 91,3 % pre (BRAF SNV) až po 100 % pre väčšinu malých variantov DNA.

Tabuľka 59 PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu malých variantov DNA v kombinovaných cielených členoch panela

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Typ variantu	Cielený variant (nukleotid)	Cielený variant (aminokyselina)	Stredná hodnota VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % interval CI ³
~2 – 3x LoD	DELÉCIA	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2 – 3x LoD	DELÉCIA	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2 – 3x LoD	INZERCIA	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
~2 – 3x LoD	INZERCIA	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	INZERCIA	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2 – 3x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2 – 3x LoD	DELÉCIA	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Typ variantu	Cielený variant (nukleotid)	Cielený variant (aminokyselina)	Stredná hodnota VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % interval CI ³
~2 – 3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2 – 3x LoD	DELÉCIA	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2 – 3x LoD	INZERCIA	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	INZERCIA	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2 – 3x LoD	DELÉCIA	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INZERCIA	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2 – 3x LoD	INZERCIA	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Úroveň variantu počítaná zo strednej pozorovanej frekvencie variantnej alely.

² Stredná frekvencia variantnej alely počítaná z pozorovaných výsledkov analýzy.

³ Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Hodnoty PNC dosiahli pri malých variantoch DNA 100 %.

Tabuľka 60 uvádza analýzu komponentov variancie výsledkov VAF pre každý zdroj variácie a celkovú variáciu vo všetkých členoch panela s cieľenými malými variantmi DNA.

Tabuľka 60 Analýza komponentov variancie VAF pre cieľené malé varianty DNA

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

Existovali dva malé cieľené varianty DNA, v súvislosti s ktorými bol počet pozorovaní príliš nízky na prispôsobenie modelu komponentov variancie. Pre tieto dva cieľené varianty dosahovala celková hodnota SD 0,027 pre variant chr1_27024001_C_CG a 0,001 pre variant chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Amplifikácie génov

Tabuľka 61 uvádza PPC pre amplifikácie cielených génov. Hodnoty PPC dosiahli 100,0 % v prípade MET a 100,0 % v prípade ERBB2.

Tabuľka 61 PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu amplifikácií génov v rámci kombinovaných cielených členov panela

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Cielený variant	Stredná pozorovaná násobná zmena ²	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI ³
~2 – 3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2 – 3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Úroveň variantu vypočítaná zo strednej hodnoty pozorovanej násobnej zmeny.

² Stredná hodnota násobnej zmeny vypočítaná z pozorovaných výsledkov analýzy.

³ Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Hodnoty PNC boli 100 % v rámci amplifikácií génov.

Tabuľka 62 uvádza analýzu komponentov variancie výsledkov násobnej zmeny pre každý zdroj variácie a celkovú variáciu vo všetkých členoch panela s amplifikáciami cielených génov.

Tabuľka 62 Analýza komponentov variancie násobnej zmeny amplifikácií cielených génov

Cielený variant	N	Stredná hodnota násobnej zmeny	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokalita) (% CV)	SD dňa (lokalita, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabuľka 63 uvádza PPC pre cielečné členy panela MSI-High. Hodnoty PPC boli 100 % pre obidva členy panela MSI-High.

Tabuľka 63 PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu stavu MSI-High v kombinovaných cielečných členoch panela

Člen panela	Stredná hodnota skóre MSI ¹	N	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
TPSBD6	55,7	32	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
Všetky členy		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Stredné pozorované skóre MSI vypočítané z pozorovaných výsledkov analýzy.

² Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 64 uvádza analýzu komponentov variancie výsledkov skóre MSI pre každý zdroj variácie a celkovú variáciu vo všetkých členoch panela, pre ktoré sa zisťoval stav MSI-High.

Tabuľka 64 Analýza komponentov variancie skóre MSI pre cielečné členy panela MSI-High

Člen panela	N	Stredná hodnota skóre MSI	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokalita) (% CV)	SD dňa (lokalita, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

Na hodnotenie reprodukovateľnosti skóre TMB sa uskutočnila kvantitatívna analýza skóre v cielečných členoch panela TMB, ktorý predstavoval rozsah očakávaných skóre TMB. **Tabuľka 65** uvádza analýzu komponentov variancie výsledkov skóre TMB pre každý zdroj variácie a celkovú variáciu v členoch panela TMB. Celkové hodnoty SD skóre TMB dosahovali 1,0 (% CV = 13) pre jeden člen panela (stredné skóre TMB = 7,6) a 1,1 (% CV = 2) pre druhý člen panela (stredné skóre TMB = 63,2).

Tabuľka 65 Analýza komponentov variancie skóre TMB pre cielečné členy panela TMB

Člen panela*	N	Stredná hodnota skóre TMB	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokalita) (% CV)	SD dňa (lokalita, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

* Existoval 1 člen panela TMB, v súvislosti s ktorým bol počet pozorovaní príliš malý (N = 2) na prispôsobenie modelu komponentov variancie. Celková hodnota SD tohto člena panela bola 1,7.

Varianty RNA

Tabuľka 66 uvádza PPC pre cielené varianty RNA. Hodnoty PPC dosiahli hodnotu od 91,7 % pre KIF5B-RET do 100 % pre väčšinu variantov RNA.

Tabuľka 66 PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu variantov RNA v kombinovaných cieľných členoch panela

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Typ variantu	Cieľný variant	Stredná hodnota podporných čítaní ²	PPC (%) (n/N)	95 % interval CI ³
> 3x LoD	Fúzia	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzia	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzia	CD74-ROS1; GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzia	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzia	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzia	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzia	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2 – 3x LoD	Fúzia	DHX8; ETV4- STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzia	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzia	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzia	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzia	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzia	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzia	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	Fúzia	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
	Fúzia	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
> 3x LoD	Fúzia	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Variant zostrihu	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2 – 3x LoD	Variant zostrihu	Vynechanie MET exónu 14	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Úroveň variantu vypočítaná zo strednej hodnoty pozorovaných podporných čítaní.² Stredná hodnota podporných čítaní vypočítaná z pozorovaných výsledkov analýzy.³ Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Hodnota PNC dosiahla 100 % pre každý cieľný variant RNA okrem fúzie FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60 % (984/988; 95 % interval CI: 98,96 % až 99,84 %)).

Tabuľka 67 uvádza analýzu komponentov variancie výsledkov podporných čítaní pre každý zdroj variácie a celkovú variáciu vo všetkých členoch panela s cieľovými variantmi RNA.

Tabuľka 67 Analýza komponentov variancie podporných čítaní pre cieľové varianty RNA

Cieľový variant	N	Stredná hodnota podporných čítaní	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokalita) (% CV)	SD dňa (lokalita, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1; GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8; ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR vIII, variant zostrihu	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Variant zostrihu s vynechaním MET exónu 14	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Presnosť v rámci laboratória

Uskutočnili sa dve štúdie zamerané na hodnotenie presnosti v rámci laboratória pre TSO Comprehensive (EU). Štúdia 1 hodnotila fúzie NTRK a RET, ako aj malé varianty DNA RET. Štúdia 2 hodnotila TMB a MSI.

Štúdia 1

Uskutočnilo sa hodnotenie presnosti detegovania fúzií NTRK1-3 v rámci laboratória (glióm nižšej triedy, multiformný glioblastóm, myofibroblastický sarkóm, rakovina vylučovacích žliaz), fúzií RET (rakovina štítnej žľazy a kožného tkaniva s neznámym typom rakoviny) a malých variantov RET DNA (medulárna rakovina štítnej žľazy) použitím tkanív FFPE z indikovaných typov rakoviny. Každá vzorka bola testovaná na dvoch úrovniach variantu: približne 1× limit LoD (nízka úroveň variantu) a približne 2 – 3× limit LoD (vysoká úroveň variantu) s výnimkou vzorky nachádzajúcej sa v CCDC6-RET, ktorá bola testovaná iba na nízkej úrovni variantu. Každá zo

vzoriek na každej úrovni testu bola spracovaná duplicitne v rámci každej prípravy knižnice troma (3) operátormi. Každý operátor začal s prípravou knižnice v priebehu troch (3) po sebe nenasledujúcich dní začiatku so sekvenovaním v troch (3) vyhradených prístrojoch NextSeq 550Dx. Boli testované tri (3) šarže reagencií, t. j. na jednu úroveň bolo generovaných 54 pozorovaní. Niektoré úrovne vykazovali menej než 54 pozorovaní v dôsledku neplatných knižníc.

Kvalitatívna analýza

Kvalitatívna konkordancia stanovenia variantov bola hodnotená osobitne pre dve úrovne daného variantu zo združených pozorovaní v rámci všetkých premenných (operátori, šarže reagencie, prístroje, dni a replikáty). Súhrnné informácie o PPC a PNC, ako aj o súvisiacom obojstrannom 95 % intervale spoľahlivosti (Wilsonovo skóre) sú uvedené v [Tabuľka 68](#) (malé varianty DNA) a [Tabuľka 69](#) (fúzie RNA).

Na vysokej úrovni variantu (približne 2 – 3-násobok limitu LoD) preukázala analýza TSO Comprehensive (EU) 100 % PPC a PNC v rámci všetkých testovaných variantov.

Na nízkej úrovni variantu (približne 1-násobok limitu LoD) bol rozsah PPC v prípade malých variantov DNA 83,3 % až 98,1 % a rozsah PPC v prípade fúzií RNA 90,7 % až 100 %. V prípade variantov s hodnotou PPC < 95 % sa stredné hodnoty VAF (RET C634Y a RET D898_E901del) alebo podporných čítaní (NCOA4-RET a BCAN-NTRK1) nachádzali pod príslušnými detekčnými limitmi. Na nízkej úrovni variantu sa u všetkých variantov dosiahla hodnota 100 % PNC.

Tabuľka 68 Kvalitatívne výsledky variantov DNA, na ktorých cieľilo sekvenovanie

Úroveň variantu	Variant	Typ variantu	Stredná hodnota VAF	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3, 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	DELÉCIA	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*	DELÉCIA	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Úroveň variantu	Variant	Typ variantu	Stredná hodnota VAF	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	DELÉCIA	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*	DELÉCIA	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Zmeny nukleotidov sú uvedené pre každý variant v časti Detekčný limit, okrem RET D631_L633delinsE, t. j. chromozóm 10, pozícia 43609940, referencia ACGAGCT, alternatíva A.

Tabuľka 69 Kvalitatívne výsledky cielených fúzií RNA

Úroveň variantu	Fúzia	Stredná hodnota podporných čítaní	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (bunková línia 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 (vzorka 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorka 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Úroveň variantu	Fúzia	Stredná hodnota podporných čítaní	PPC (%) (n/N) (95 % CI)	PNC (%) (n/N) (95 % CI)
~2 – 3x LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (Bunková línia 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	Nevzťahuje sa	Netestované	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorka 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorka 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kvantitatívna analýza

Uskutočnila sa analýza komponentov variancie s obmedzeným odhadom maximálnej pravdepodobnosti (vierohodnosť, REML), ktorej cieľom bolo hodnotenie celkovej variácie základných kontinuálnych premenných (VAF v prípade malých variantov DNA a podporné čítania v prípade fúzií RNA) a odhadnutie komponentov presnosti [štandardná odchýlka (SD), koeficient variácie (CV)] pre každý zdroj variácie [operátori, prístroje, dni, šarže reagensí, reziduá a celkom]. Výsledky uvádzajú [Tabuľka 70](#) (malé varianty DNA) a [Tabuľka 71](#) (fúzie RNA).

Variácia pri VAF rástla spolu so strednou hodnotou podľa očakávania pre binomiálnu distribúciu. Variácia pri podporných čítaniach rástla spolu so strednou hodnotou podľa predpokladu platného pre počty. Reziduálny komponent mal najvyšší podiel na celkovej variancii malých variantov DNA aj fúzií RNA na obidvoch úrovniach, čo podporuje záver, že detekcia týchto variantov analýzou TSO Comprehensive (EU) je z hľadiska operátorov, šarží, prístrojov a dní robustná.

Tabuľka 70 Kvantitatívne výsledky SD a CV pre malé varianty DNA, na ktoré cieľila analýza

Úroveň VAF	Variant	Typ variantu	N platných pokusov	Stredná hodnota VAF	SD operátora (% CV)	SD prístroja (% CV)	SD šarže (% CV)	SD dňa (% CV)	Reziduálna SD (% CV)	Celková SD (% CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELÉCIA	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	DELÉCIA	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	DELÉCIA	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	DELÉCIA	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)

Tabuľka 71 Kvantitatívne výsledky SD a CV cielených fúzií RNA

Úroveň podporných čítaní	Fúzia	N platných pokusov	Stredná hodnota podporných čítaní	SD operátora (% CV)	SD prístroja (% CV)	SD šarže (% CV)	SD dňa (% CV)	Reziduálna SD (% CV)	Celková SD (% CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (bunková línia)	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 (Vzorka 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (Vzorka 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)
2 – 3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (bunková línia)	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 (Vzorka 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (Vzorka 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Štúdia 2

Uskutočnilo sa hodnotenie TMB a MSI z hľadiska presnosti v rámci laboratória. Na hodnotenie presnosti na rôznych úrovniach v rámci rozsahov skóre bolo použitých päť vzoriek NSCLC FFPE DNA (TMB) a sedem vzoriek CRC FFPE (MSI) vrátane mikrosatelitne stabilnej (MS-Stable) vzorky a vzorky s vysokou úrovňou MSI (MSI-High). Každá zo vzoriek bola spracovaná duplicitne troma (3) operátormi, počas troch (3) dní použitím troch (3) príprav knižnice pre tri (3) šarže reagentií pomocou troch prístrojov NextSeq 550Dx, výsledkom čoho bolo 54 pozorovaní na jednu úroveň.

Kvalitatívna konkordancia bola hodnotená pre stav MSI. Analýza TSO Comprehensive (EU) preukázala 100 % konkordanciu z hľadiska percenta pozitívnych stanovení a percenta negatívnych stanovení stavu MSI. V prípade TMB vykazuje analýza TSO Comprehensive (EU) skóre TMB; kvalitatívnu konkordanciu nemožno uplatniť.

Celková variácia skóre TMB a MSI spolu s podielom podľa zdroja (prístroje, operátori, šarže, dni a reziduum) bola kvantifikovaná použitím modelu komponentov variancie v rámci rozsahu skóre. Štandardná odchýlka (SD) a koeficient variácie (CV) sú uvedené v [Tabuľka 72](#) (TMB) a v [Tabuľka 73](#) (MSI) podľa úrovne. Niektoré úrovne vykazovali menej než 54 pozorovaní v dôsledku neplatných knižníc.

Tabuľka 72 Kvantitatívne výsledky SD a CV skóre TMB

Úroveň	Stredná hodnota skóre TMB	N platných pokusov	SD operátora (% CV)	SD prístroja (% CV)	SD šarže (% CV)	Denná hodnota SD (% CV)	Reziduálna SD (% CV)	Celková štandardná odchýlka (% 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)

Tabuľka 73 Kvantitatívne výsledky SD a CV skóre MSI

Stav MSI	Úroveň	Stredná hodnota skóre MSI (%)	N platných pokusov	SD operátora (% CV)	SD prístroja (% CV)	SD šarže (% CV)	SD dňa (% CV)	Reziduálna SD (% CV)	Celková štandardná odchýlka (% CV)
MS-stabilné	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)

Variácia skóre TMB má tendenciu rásť spolu so strednou hodnotou podľa predpokladu odvodeného z teoretických distribúcií údajov počtu. Variácie skóre MSI pre úrovne blízke sa skóre MSI = 50 sú väčšie než variácie skóre MSI blízke sa 0 alebo 100, čo je konzistentné s variabilitou z teoretických distribúcií proporčných údajov. Reziduálny komponent ostal prvkom s najvyšším podielom na celkovej variancii skóre MSI aj TMB, čo podporuje záver, že skóre sú z hľadiska operátorov, šarží, prístrojov a dní robustné. MSI a TMB sú však komplexné biomarkery a analytická účinnosť sa medzi jednotlivými vzorkami môže odlišovať. To znamená, že variácia TMB nezávisí iba od hodnoty TMB, ale aj od zloženia variantov vo vzorke, ako sú napríklad typ variantu (SNV, Indel) a úroveň VAF (vzdialenosť od hraničnej hodnoty zahrnutia). Podobne aj variácia MSI nezávisí iba od hodnoty MSI, ale aj od zloženia lokalít vo vzorke, ako napríklad počet nestabilných lokalít a rozsah nestability danej lokality.

Hodnoty C5 a C95 blízke sa hraničnej hodnote 20,00 % boli stanovené pre MSI pomocou profilu presnosti ([Tabuľka 74](#)).

Tabuľka 74 Interval C5 – C95 pre MSI

Skóre	C5	C95
MSI	17,17 %	23,32 %

Uskutočnilo sa hodnotenie vplyvu obsahu tumoru na skóre TMB a MSI. V rámci väčšiny vzoriek mal tumor s obsahom ≥ 30 % zanedbateľný vplyv na skóre TMB približne nad 10 mutácií na megabázu. S rastúcim obsahom tumoru ostali skóre TMB relatívne nezmenené. V prípade vzoriek MSI-High vykazoval obsah tumoru pozitívnu lineárnu koreláciu so skóre MSI. Vzorky MSI-High ostali vzorkami s priemernou hodnotou MSI-High v prípade obsahu tumoru ≥ 30 %. Vzorky endometrie sa správali výrazne odlišne než iné druhy tkaniva a vyžadovali vyšší podiel tumoru na to, aby boli stanovené ako MSI-High.

Správnosť pre profilovanie tumoru

Detekcia variantov analýzou TSO Comprehensive (EU) bola porovnaná s výsledkami referenčných metód. Malé varianty DNA a TMB boli porovnané s externou validovanou metódou NGS sekvenovania celého exómu. Amplifikácie génov boli porovnané s metódou NGS rovnakého celého exómu alebo boli validované pomocou metódy duálnej hybridizácie in-situ (DISH) v prípade amplifikácií HER2. MSI bola hodnotená pomocou validovaného testu MSI-PCR. Varianty zrostihu RNA boli porovnané s validovanou kvantitatívnou metódou PCR (qPCR). Fúzie ROS1 a ALK boli porovnané s validovanými analýzami FISH. Všetky ostatné fúzie boli porovnané s kompozitnou metódou skladajúcou sa z validovanej analýzy celého exómu NGS (RNGS1), cieleného panela NGS (RNGS2) a kvapôčkovej digitálnej PCR (ddPCR).

Detekcia malých variantov DNA

Detekcia malých variantov DNA podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) bola porovnaná s výsledkami sekvenovania celého exómu (WES), ktoré využíva metódu WES spolu so vzorkami tumorov priradenými k vzorkám normálneho tkaniva toho istého jedinca na stanovenie malých zárodočných a somatických variantov. Porovnanie medzi malými variantmi, pozostávajúcimi z variantov jedného nukleotidu (SNV), inzercií a delécií, bolo založené na 124 vzorkách zo 14 rôznych typov tkanív, ktoré boli platné pre analýzu TSO Comprehensive (EU) aj WES. Analýza TSO Comprehensive (EU), ale nie analýza WES dokáže detegovať multinukleotidové varianty (MNV, 2 – 3 bp), čo si vyžaduje fázovanie. TSO Comprehensive (EU) MNV boli hodnotené ako jednotlivé SNV v porovnaní s analýzou WES. Súhrnné informácie o konkordancii na úrovni variantu vrátane percenta pozitívnej zhody (PPA) a percenta negatívnej zhody (NPA) pre všetky stanovenia variantov uvádza [Tabuľka 75](#).

Tabuľka 75 Súhrnné informácie o konkordancii pre stanovenie malých variantov hodnotených podľa stavu zárodočných alebo somatických buniek

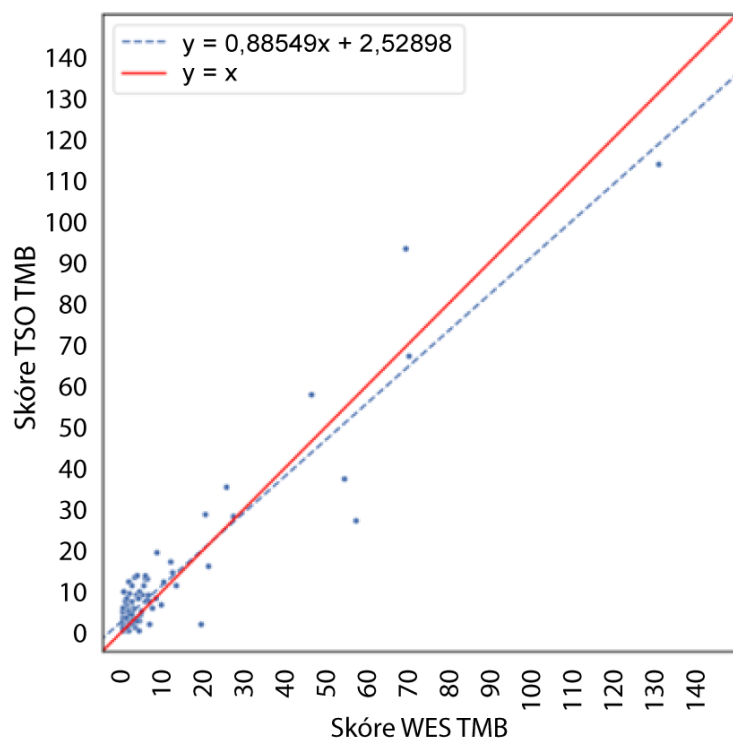
	Sekvenovanie WES somatických buniek – stanovené	WES Germline Called	WES – nestanovené
Stanovené analýzou TSO Comprehensive (EU)	382	33 163	426
Nestanovené analýzou TSO Comprehensive (EU)	69	61	70 000 481
Celkom	451	33 224	70 000 907
Percentuálna zhoda	PPA: 85 % (382/451), 95 % interval CI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33 163/33 224) 95 % interval CI: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70 000 481/70 000 907) 95 % interval CI: [99,999 %, 99,999 %]

Analýzou TSO Comprehensive (EU) bolo celkom stanovených 426 variantov, ktoré neboli metódou WES detegované. Dvestoštyri (48 %) spomedzi týchto variantov vykazovalo frekvencie variantnej alely pod prahovou hodnotou stanovenia metódou WES. Spomedzi zostávajúcich potenciálnych falošne pozitívnych variantov existoval dôkaz o stanovení variantu metódou WES s nízkou mierou podpory. Okrem toho mnohé varianty vykazovali veľmi nízku úroveň dôkazov pri použití metódy WES v priradených vzorkách normálneho tkaniva. Tento výsledok naznačuje, že tieto varianty boli pri analýze WES vynechané z dôvodu kontaminácie normálneho tkaniva bunkami tumoru.

Detekcia mutačnej záťaže tumoru (TMB)

Konkordancia TMB bola určená porovnaním skóre TMB (somatické mutácie/megabáza) metódy WES a analýzy TSO Comprehensive (EU) na 124 vzorkách s dostupnými údajmi z analýzy TSO Comprehensive (EU) aj WES. Lineárna regresná analýza s metódou WES ako prediktorom vykazovala hodnotu y-zachytenia 2,53, strmosť 0,89 a Pearsonov koeficient korelácie 0,94 ([Obrázok 3](#)).

Obrázok 3 Korelácia skóre TMB medzi WES a analýzou TSO Comprehensive (EU)



Detekcia amplifikácie génov

Detekcia amplifikácií génov pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) bola porovnaná s výsledkami rovnakej analýzy WES s využitím buď vzoriek tumorov priradených k vzorkám normálneho tkaniva toho istého jedinca, alebo vzoriek odobratých iba tumoru. Celkom išlo o 420 vzoriek, spomedzi ktorých sa pri 183 použila metóda ortogonálneho odberu z tumoru a normálneho (zdravého) tkaniva a 237 použilo metódu, pri ktorých sa vzorky odobrali iba z tumoru. Zo 420 vzoriek bolo na štúdiu vybraných 50 vzoriek, pretože boli pozitívne na amplifikáciu pomocou testu TSO Comprehensive (EU) alebo pomocou predchádzajúceho testu. Výkonnosť týchto charakterizovaných vzoriek sa upravila pomocou priemernej prevalencie fúzie. Kombinovaný výkon naprieč charakterizovanými a necharakterizovanými vzorkami používal vážený priemer pre inverznú varianciu. Vzorky boli zo 14 typov tkanív a obsahovali amplifikácie z 55 génov. Analýza TSO Comprehensive (EU) vykazuje amplifikácie génov z génov MET a ERBB2. Správnosť však bola hodnotená pre všetkých 55 génov. Súhrn stanovení amplifikácie génov uvádza [Tabuľka 76](#).

Tabuľka 76 Súhrn konkordancie pre génovú amplifikáciu

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

* Interval spoľahlivosti vypočítaný pomocou opakovaného náhodného výberu.

Amplifikácie ERBB2 (HER2) prítomné v tkanivách žalúdka a prsníka boli analyzované osobitne od iných amplifikácií génov použitím metódy duálnej hybridizácie in-situ (DISH). Celkom bolo testovaných 116 vzoriek prsného a žalúdočného tkaniva, spomedzi ktorých bolo 64 predtým charakterizovaných ako pozitívnych na HER2 podľa metódy IHC alebo FISH. Extrakcia jednej vzorky zlyhala, 4 vzorky vykazovali neúspešnú platnosť na analýzu TSO Comprehensive (EU) a 3 vzorky vykazovali neúspešnú platnosť na analýzu DISH. Spomedzi 108 vzoriek získalo 20 (18,5 %) hraničné skóre (od 1,5 do 2,5) v blízkosti hraničnej hodnoty DISH 2,0. Výsledky konkordancie vrátane PPA, NPA pre všetky vzorky, ako aj s vylúčením hraničných prípadov HER2 DISH, uvádza [Tabuľka 77](#).

Tabuľka 77 Súhrnné informácie o konkordancii medzi analýzou TSO Comprehensive a HER2 DISH vrátane amplifikácie génu HER2

Amplifikácia génu HER2 Všetky (tkanivo prsníka a žalúdka)	HER2 DISH s amplifikáciou	HER2 DISH bez amplifikácie
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	17 (vrátane 1 hraničného prípadu)	13 (vrátane 1 hraničného prípadu)
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	10 (vrátane 6 hraničných prípadov)	68 (vrátane 12 hraničných prípadov)
Percentuálna zhoda vrátane hraničných prípadov	PPA: 63 % (17/27) 95 % interval CI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % interval CI: [74 %, 90 %]
Percentuálna zhoda s vylúčením hraničných prípadov	PPA: 80 % (16/20) 95 % interval CI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % interval CI: [72 %, 90 %]

Detekcia mikrosatelitnej nestability

Detekcia mikrosatelitnej nestability podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) bola porovnaná s výsledkami validovaného testu MSI-PCR, ktorý využíva na testovanie vzorky tumorov priradené k vzorkám normálneho tkaniva toho istého jedinca. Porovnaných bolo celkom 195 vzoriek spĺňajúcich požiadavku na obsah tumoru ≥ 30 % (pre stav MS-Stable) a predstavujúcich 14 typov tkaniva. Test MSI-PCR hodnotí 5 lokalít a poskytuje 3 výstupy – MSI-Stable (bez nestabilných lokalít), MSI-Low (jedna nestabilná lokalita) a MSI-High (dve alebo viac nestabilných lokalít). TSO Comprehensive (EU) hodnotí až 130 mikrosatelitných lokalít a klasifikuje vzorky iba ako MSI-Stable alebo MSI-High (≥ 20 % nestabilných lokalít). V prípade MSI-PCR boli výsledky MSI-Low zoskupené s výsledkami MSI-Stable. Analýzu konkordancie uvádza [Tabuľka 78](#).

Tabuľka 78 Súhrn analýzy konkordancie medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a testom MSI-PCR pre mikrosatelitnú nestabilitu DNA

Stav MSI	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSI-Stable
TSO Comprehensive (EU) Nestabilné (MSI-High)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stable (MS-Stable)	3	0	150
Celkom	44	2	150
Percentuálna zhoda	PPA: 93 % (41/44) 95 % interval CI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % interval CI: [95 %, > 99 %]	

Detekcia variantov zostrihu RNA

Presnosť detekcie variantov zostrihu bola počítaná formou porovnania výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) s analýzami qPCR zameranými na EGFRvIII a vynechanie MET exónu 14 vrátane jednej známej pozitívnej RNA pre každý z variantov zostrihu. Analýza konkordancie bola vykonaná s celkovým počtom 230 jedinečných vzoriek FFPE RNA zo 14 typov tkanív s dostupnými údajmi podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a referenčnej metódy. Všetky vzorky boli testované na vynechanie MET exónu 14, pričom EGFRvIII bol testovaný iba v mozgovom tkanive. Tri vzorky boli stanovené ako pozitívne pre vynechanie MET exónu 14 podľa metódy qPCR, nie však podľa analýzy TSO Comprehensive (EU), vykazovali priemernú hodnotu Ct > 37 a boli pod úrovňou limitu LoD analýzy TSO Comprehensive (EU). [Tabuľka 79](#) uvádza súhrn výsledkov štúdie konkordancie.

Tabuľka 79 Súhrn analýzy konkordancie medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a analýzou qPCR pre varianty zostrihu RNA

Varianty zostrihu RNA	Pozitívne podľa qPCR	Negatívne podľa qPCR
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	3	0
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	0	13
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (Vynechanie MET exónu 14)	1	0
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (Vynechanie MET exónu 14)	3	217

Varianty zozrihu RNA	Pozitívne podľa qPCR	Negatívne podľa qPCR
Celkom	7	230
Percentuálna zhoda	PPA: 57 % (4/7) 95 % interval CI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % interval CI: [98 %, 100 %]

Detekcia fúzií RNA

Porovnanie s kompozitnou metódou

Fúzie TSO Comprehensive (EU) boli porovnané s kompozitnou metódou pozostávajúcou zo sekvenovania celého exómu RNA použitím panela NGS (RNGS1), panela cielených fúzií NGS (RNGS2) a kvapôčkovej digitálnej PCR (ddPCR, droplet digital PCR).

Metóda RNGS1 sa prekrýva so všetkými génmi, pre ktoré dokáže analýza TSO Comprehensive (EU) detegovať fúzie. Detekčný limit metódy RNGS1 však predstavoval 4- až 8-násobok detekčného limitu TSO Comprehensive (EU) na základe počtu podporných čítaní pozorovaných v stanoveniach prekrývajúcich sa fúzií. Znamená to, že s metódou WES (RNGS1) bola použitá kompozitná metóda spolu s dvoma ďalšími metódami s vyššou citlivosťou, ale menším rozsahom pre fúzie.

Pomocou metódy RNGS1 bolo testovaných celkom 255 jedinečných vzoriek RNA predstavujúcich 14 typov tkaniva, ktoré úspešne splnili metriky analýzy TSO Comprehensive (EU). V rámci kontroly kvality metódy RNGS1 boli dve vzorky neplatné a z ďalšej analýzy boli vylúčené. Spomedzi 82 fúzií stanovených analýzou TSO Comprehensive (EU) boli 4 vylúčené z hodnotenia v dôsledku zlyhaní počas kontroly kvality vzorky metódy RNGS1 a 7 ďalších fúzií nebolo možné stanoviť v dôsledku neexistencie cieľov v paneli RNGS1. Zo zvyšných 71 fúzií stanovených analýzou TSO Comprehensive (EU) metóda RNGS1 potvrdila 9 fúzií. Metóda RNGS1 stanovila 4 fúzie, ktoré neboli stanovené analýzou TSO Comprehensive (EU).

Spomedzi 62 fúzií, ktoré boli podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) pozitívne a neboli detegované metódou RNGS1, bolo 13 prekrývajúcich sa a potvrdených metódou RNGS2. Metóda RNGS2 stanovila jednu fúziu, ktorá nebola stanovená analýzou TSO Comprehensive (EU).

Kvapôčková digitálna PCR bola následne použitá pre fúzie stanovené analýzou TSO Comprehensive (EU), nestanovené alebo bez možnosti ich stanovenia metódou RNGS1 a nehodnotiteľné metódou RNGS2 (49). Okrem toho bola ddPCR použitá na opakované hodnotenie 2 zo 4 falošne negatívnych fúzií podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy RNGS1, a 2 z 9 konkordantných fúzií podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy RNGS1. Na zaistenie špecificity bolo zahrnutých päť vzoriek negatívnych z hľadiska stanovenia fúzií do testovania každej pozitívnej vzorky fúzie. Osemnásť fúzií nebolo testovaných pomocou metódy ddPCR v dôsledku nemožnosti vytvoriť návrh primérov/sond, viacnásobných génových partnerov fúzie alebo nedostatku zvyšného materiálu FFPE. V prípade ddPCR boli priméry a sondy navrhnuté vzhľadom na pozorované body zlomu v analýze TSO Comprehensive (EU).

Celkom bolo detegovaných 52 fúzií pomocou metódy ddPCR, z ktorých 41 bolo stanovených analýzou TSO Comprehensive (EU), ale nebolo stanovených alebo nebolo stanoviteľných metódou RNGS1. Deväť fúzií bolo stanovených metódou ddPCR, ktoré však boli negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) alebo RNGS1. Dve fúzie pozitívne podľa ddPCR potvrdili 2 konkordantné fúzie podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy RNGS1. Žiadna fúzia nebola detegovaná metódou ddPCR v prípade 2 opakovane hodnotených falošne negatívnych vzoriek podľa TSO Comprehensive (EU) s metódou RNGS1; na základe porovnania s RNGS1 však tieto vzorky boli započítané ako falošne negatívne.

Z 255 vzoriek bolo 35 vzoriek vybraných pre štúdiu, pretože boli pozitívne na fúziu pomocou testu TSO Comprehensive (EU) alebo pomocou predchádzajúceho testu. Výkonnosť týchto charakterizovaných vzoriek sa upravila pomocou priemernej prevalencie fúzie. Kombinovaný výkon naprieč charakterizovanými a necharakterizovanými vzorkami používal vážený priemer pre inverznú varianciu. Metódy získania kompozitných konkordantných výsledkov pre fúzie uvádza [Tabuľka 80](#).

66 fúzií (54 jedinečných fúzií) konkordantných s kompozitnou metódou predstavovalo 43 génov na paneli TSO Comprehensive (EU). Fúzie sú však spôsobilé na vykazovanie iba spomedzi 23 génov indikovaných v [Tabuľka 80](#).

Tabuľka 80 Súhrn konkordancie pre fúzie RNA

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

* Interval spoľahlivosti vypočítaný pomocou opakovaného náhodného výberu.

Porovnanie s metódou FISH pre fúzie ROS1 a ALK

Dvadsaťpäť vzoriek NSCLC bolo testovaných metódou FISH z hľadiska fúzií ROS1 a ALK, a 5 ďalších vzoriek NSCLC bolo testovaných z hľadiska fúzií ROS1. Osem vzoriek v dôsledku nedostatočného tkaniva v rámci metódy FISH pre fúziu ROS1 zlyhalo. Dve fúzie ROS1 a jedna fúzia ALK boli detegované analýzou TSO Comprehensive (EU) aj metódou FISH. Neboli pozorované žiadne nekonkordantné výsledky. [Tabuľka 81](#) obsahuje súhrn výsledkov konkordancie analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy FISH pre fúzie ROS1 a ALK.

Tabuľka 81 Súhrn výsledkov konkordancie analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy FISH pre fúzie ROS1 a ALK

ALK + ROS1	Pozitívne podľa metódy FISH	Negatívne podľa metódy FISH
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	3	0
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	0	44
Celkom	3	44
Percentuálna zhoda	PPA: 100 % (3/3) 95 % interval CI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % interval CI: [92 %, 100 %]

Platnosť vzoriek

Platnosť vzoriek (prvý pokus) bola odmeraná pre 181 jedinečných vzoriek RNA a 272 jedinečných vzoriek DNA z blokov FFPE vo veku ≤ 5 rokov. Tieto vzorky boli vybraté na základe typu tkaniva a dostupného materiálu; platnosť analýzy bola neznáma. Metriky kontroly kvality knižnice musia splniť podmienky pre typ variantu, aby

boli považované za platné. Platnosť vzoriek bola hodnotená osobitne pre každý z typov variantov (malé varianty DNA/TMB, MSI, amplifikácie génov, fúzie/varianty zostrihu) a sú uvedené v [Tabuľka 82](#). Predpokladá sa ďalšie zníženie platnosti MSI o 1 % pre bloky FFPE ≤ 2 roky z dôvodu prepravy reagentov.

Tabuľka 82 Platnosť vzoriek

Typ variantu	Platnosť vzoriek
Fúzie/varianty zostrihu (RNA)	76 %
Malé varianty DNA/TMB	75 %
MSI	72 %
Amplifikácia génov	94 %

Súhrn analytickej validácie predpokladov profilovania tumoru

Na základe údajov o detekčnom limite, presnosti, reprodukovateľnosti a presnosti bola analýza TSO Comprehensive (EU) analyticky validovaná z hľadiska nasledujúcich faktorov:

- Malé varianty DNA – SNV, MNV, inzercie a delécie.
- TMB
- MSI
- Amplifikácie génov MET a ERBB2 (HER2) (pozrite si [Tabuľka 2](#)).
- 23 génov, pre ktoré je možné detegovať fúzie (pozrite si [Tabuľka 2](#)).
- Varianty zostrihu EGFR a MET (pozrite si [Tabuľka 2](#)).

Klinická účinnosť NTRK

Na validáciu analýzy TSO Comprehensive (EU) ako pomocného diagnostického nástroja (CDx) pre výber pacientov na liečbu produktom VITRAKVI (larotrectinib) boli testované vzorky od pacientov zaregistrovaných do klinických skúšaní larotrectinibu (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; spolu ako vzorky klinického skúšania larotrectinibu) s hraničným termínom získavania údajov 15. JÚLA 2019, doplnené komerčne získanými tkanivovými vzorkami FFPE, s cieľom podporiť štúdiu presnosti analýzy TSO Comprehensive (EU) a doplnkovú klinickú štúdiu.

NCT02122913 bola multicentrická otvorená štúdia fázy 1 s eskaláciou dávky u dospelých pacientov s pokročilými solídnymi tumormi (všetci) nevybratými pre rakovinu s pozitívnym nálezom fúzie NTRK. Po dokončení časti štúdie s eskaláciou dávky bolo iniciované rozšírenie dávky u pacientov so zdokumentovanou rakovinou, u ktorých sa zistila fúzia NTRK, a u pacientov, u ktorých bol skúšajúci presvedčený, že by mohli mať prínos z použitia vysoko selektívneho inhibítora TRK. NAVIGATE NCT02576431 je pokračujúca multicentrická otvorená štúdia fázy 2 typu „basket“ u pacientov vo veku 12 rokov a viac s pretrvávajúcimi pokročilými solídnymi tumormi a zdokumentovanou fúziou NTRK hodnotenou externým laboratóriom. SCOUT

NCT02637687 je pokračujúca multicentrická otvorená štúdia fázy 1/2 u detských pacientov počnúc vekom narodenia po dosiahnutí 21 rokov s pokročilými solídnymi tumormi alebo tumormi centrálnej nervovej sústavy (CNS).

Spomedzi pacientov pozitívnych na fúziu NTRK zahrnutých do štúdie analýzy TSO Comprehensive (EU) vytvorilo 164 rozšírenú skupinu primárnej účinnosti larotrectinibu (ePAS4).

Štúdia presnosti detekcie fúzií NTRK1, NTRK2, NTRK3

Presnosť detekcie analýzy TSO Comprehensive (EU) pri detegovaní fúzií NTRK (NTRK1, NTRK2 alebo NTRK3) u pacientov so solídnymi tumormi bola preukázaná hodnotením výsledkov konkordancie fúzie NTRK medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a validovanou ortogonálnou metódou na základe sekvenovania novej generácie (NGS).

Uskutočnila sa retrospektívna neintervenčná štúdia. Vzorky z klinického skúšania larotrectinibu a ďalšie vzorky boli testované analýzou TSO Comprehensive (EU) na jednom externom pracovisku a ortogonálnou metódou v centrálnom laboratóriu. Presnosť stanovení fúzie NTRK analýzy TSO Comprehensive (EU) bola odhadnutá vzhľadom na ortogonálnu metódu; boli počítané percento pozitívnej zhody (PPA), percento negatívnej zhody (NPA) a súvisiace obojstranné intervaly spoľahlivosti (95 % CI).

Testovaných bolo 516 vzoriek pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) a/alebo ortogonálnej metódy. Spomedzi týchto vzoriek bolo testovaných 499 vzoriek obidvoma metódami. Sedemnást spomedzi 516 vzoriek nebolo testovaných žiadnou z uvedených analýz v dôsledku neúspešnej extrakcie, z neznámeho dôvodu (platí pre ortogonálnu metódu) alebo z dôvodu odchýlky od protokolu. Spomedzi 499 vzoriek testovaných obidvoma metódami bolo 170 (34,1 %) vzoriek vzorkami z klinického skúšania larotrectinibu a 329 (65,9 %) bolo doplnkových vzoriek.

Križovú tabuľku výsledkov pre 499 vzoriek uvádza [Tabuľka 83](#). Spomedzi 499 vzoriek vykazovalo 85 vzoriek neplatné výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU), 53 spomedzi týchto 85 taktiež vykazovalo neplatné výsledky ortogonálnej metódy. Ďalších sedem vzoriek vykazovalo neplatné výsledky ortogonálnej metódy. To znamená, že 407 zo 499 vzoriek vykazovalo platné výsledky podľa obidvoch metód.

Tabuľka 83 Štúdia presnosti NTRK: Výsledky podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a podľa ortogonálnej metódy pri detekcii fúzií NTRK

Výsledok analýzy TSO Comprehensive (EU)	Výsledok ortogonálnej metódy			
	Fúzia NTRK – pozitívne	Fúzia NTRK – negatívne	Neplatné	Celkom
Fúzia NTRK – pozitívne	114	16	1	131
Fúzia NTRK – negatívne	4	273	6	283
Neplatné*	4	28	53	85
Celkom	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) Neplatné výsledky analýzy pochádzajúce zo vzorky a úrovne chodu.

Analýzy zhody s vylúčením a zahrnutím neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) uvádza [Tabuľka 84](#). Po vylúčení neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) dosiahla hodnota PPA 96,6 % (114/118; 95 % CI: 91,5 % – 99,1 %) a NPA dosiahla 94,5 % (273/289; 95 % CI: 91,2 % – 96,8 %).

Tabuľka 84 Štúdia presnosti NTRK: Hodnoty PPA a NPA analýzy TSO Comprehensive (EU) porovnané s výsledkami ortogonálnej metódy pri detekcii fúzií NTRK

	Okrem neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU)		Vrátane neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU)	
Miera zhody	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI*	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI*
PPA	96,6 (114/118)	91,5, 99,1	93,4 (114/122)	87,5, 97,1
NPA	94,5 (273/289)	91,2, 96,8	86,1 (273/317)	81,8, 89,7

* 95 % interval CI podľa (presnej) Clopper-Pearsonovej metódy.

Doplnková klinická štúdia na detekciu fúzií NTRK1, NTRK2, NTRK3

Klinická platnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) pri detekcii fúzií NTRK1, NTRK2 alebo NTRK3 u pacientov so solídnymi tumormi, ktorí môžu mať prínos z liečby larotrectinibom, bola preukázaná v rámci doplnkovej klinickej štúdie. Štúdia sa uskutočnila s cieľom zhodnotiť klinickú účinnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) pri identifikácii pacientov s fúziou NTRK1, NTRK2 alebo NTRK3 vhodných na liečbu larotrectinibom, a na hodnotenie konkordancie medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a lokálnymi testovacími metódami (LT) (používanými na určovanie stavu fúzie NTRK počas klinických skúšaní larotrectinibu).

Metódy LT zahŕňali NGS, fluorescenčnú hybridizáciu in situ (FISH), polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) a analýzy NanoString. Fúzie NTRK (ETV6 NTRK3) boli odvodené od pacientov s infantilným fibrosarkómom, ktorí vykazovali zdokumentovanú translokáciu ETV6 identifikovanú metódou FISH. Väčšina spomedzi 235 pacientov v klinickom skúšaní larotrectinibu so známym stavom fúzie NTRK bola testovaná metódami NGS.

K hraničnému termínu získavania údajov 15. júla 2019 bolo zaregistrovaných 279 pacientov. Spomedzi 279 pacientov bolo 208 pozitívnych na fúziu NTRK. Spomedzi 208 pozitívnych pacientov 164 vytvorilo skupinu ePAS4 pre larotrectinib.

Primárnym výstupom analýzy účinnosti larotrectinibu bola celková miera liečebnej odpovede (overall response rate, ORR) podľa hodnotenia nezávislej kontrolnej komisie (IRC) v rámci združeného súboru údajov z troch klinických štúdií. Miera ORR bola hodnotená podľa pomeru pacientov s najlepšou celkovou mierou liečebnej odpovede potvrdenej úplnej alebo čiastočnej liečebnej odpovede podľa kritérií RECIST, verzia 1.1. Miera ORR pre larotrectinib v kohorte ePAS4 bola 72,6 % (95 % CI [65,1 %, 79,2 %]) a zahŕňala pacientov so 16 odlišnými typmi tumoru.

Počítanie vzoriek

Súbor vzoriek zahŕňal zastúpenie širokej škály typov tumorov a vzoriek od detských a dospelých pacientov.

K 15. júlu 2019 bolo do štúdie larotrectinibu zaregistrovaných 279 pacientov. Spomedzi nich vykazovalo 235 pacientov známy status fúzie NTRK stanovený metódou LT: 208 bolo pozitívnych a 27 negatívnych. V prípade 44 pacientov bol stav fúzie NTRK neznámy, keďže sa nevyžadovalo testovanie pacientov na splnenie podmienok vo fázach eskalácie dávky v štúdiách NCT02122913 a SCOUT NCT02637687. V prípade doplnkovej klinickej štúdie analýzy TSO Comprehensive (EU) boli vzorky od pacientov zúčastňujúcich sa na klinickom skúšaní larotrectinibu, ktorí boli zaregistrovaní k 15. júlu 2019 so známym stavom fúzie NTRK (208 pozitívnych a 27 negatívnych pacientov) a doplnkové vzorky, ktoré boli pomocou reprezentatívnych metód LT kategorizované ako negatívne na fúzie NTRK, určené ako spôsobilé pre túto štúdiu.

Spomedzi 208 pozitívnych vzoriek z klinického skúšania larotrectinibu bolo 154 vzoriek dostupných na testovanie pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU). Spomedzi nich vykazovalo 138 platné výsledky. Pätnásť vzoriek bolo negatívnych v dôsledku zlyhania metriky kvality sekvenovania vzoriek a 1 vzorka nebola testovaná v dôsledku odchýlky od protokolu. Spomedzi 27 negatívnych vzoriek z klinického skúšania larotrectinibu bolo 24 vzoriek dostupných na testovanie. Spomedzi nich vykazovalo 22 platné výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU). Dve vzorky boli neplatné v dôsledku zlyhania metriky kvality sekvenovania vzorky.

Pomocou jednej z dvoch reprezentatívnych metód LT bol vykonaný skrining doplnkových vzoriek. Dohromady bolo spracovaných viac než 350 vzoriek, ktoré boli analyzované z hľadiska obsahu tumoru. Spomedzi doplnkových vzoriek, ktoré spĺňali požiadavky na vzorky, bolo 266 vzoriek úspešne extrahovaných a reprezentatívnou metódou LT potvrdených ako negatívnych, pokiaľ ide o fúziu NTRK. Spomedzi týchto vzoriek bolo 260 dostupných na analytické testovanie TSO Comprehensive (EU), výsledkom ktorého bolo 222 platných výsledkov. 38 vzoriek bolo neplatných v dôsledku zlyhania metriky sekvenovania vzoriek ($n = 25$) alebo zlyhania chodu sekvenovania ($n = 13$). Celý súbor negatívnych vzoriek vzhľadom na fúziu NTRK sa skladal z 222 doplnkových vzoriek a 22 vzoriek z klinického skúšania larotrectinibu.

Výsledky konkordancie

Celkovo bolo analýzou TSO Comprehensive (EU) testovaných 437 vzoriek. Spomedzi 208 pacientov pozitívnych na fúziu NTRK bolo 153, ktorí mali k dispozícii vzorky a boli testovaní analýzou TSO Comprehensive (EU), čo viedlo k 138 platným výsledkom a 15 neplatným výsledkom.

Zhoda výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) a výsledkov metód LT s neplatnými výsledkami TSO Comprehensive (EU) a bez nich je uvedená v [Tabuľka 85](#).

Tabuľka 85 Doplnková klinická štúdia NTRK: Konkordancia medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódami LT pri detekcii fúzií NTRK

Miera zhody	Okrem neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU)		Vrátane neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU)	
	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI*	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI*
PPA	89,1 (123/138)	82,7, 93,8	80,4 (123/153)	73,2, 86,4
NPA	96,3 (235/244)	93,1, 98,3	82,7 (235/284)	77,8, 87,0
OPA	93,7 (358/382)	90,8, 95,9	81,9 (358/437)	78,0, 85,4

* Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti boli počítané pomocou (presnej) Clopper-Pearsonovej metódy.

Analýza citlivosti týkajúca sa chýbajúcich výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) preukázala robustnosť analýzy zhody. Chýbajúce výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) pre pacientov pozitívnych na fúziu LT NTRK (n = 70) boli priradené pomocou modelu logistickej regresie. Odhady zhody vrátane priradených hodnôt uvádza [Tabuľka 86](#).

Tabuľka 86 Doplnková klinická štúdia NTRK: Konkordancia medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódami LT pri detekcii fúzií NTRK vrátane priradených hodnôt pre pacientov pozitívnych podľa metódy LT s chýbajúcimi výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU)

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

Chýbajúce výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) pre pacientov s nezistenou fúziou podľa metódy LT neboli priradené.

* Obojstranné intervaly spoľahlivosti 95 % boli počítané podľa metódy viacnásobného priradenia Boot. Metóda viacnásobného priradenia Boot je krok typu bootstrap vnorený do metódy Multiple Imputation (Schomaker a Heumann 2018).

Zhody medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódami LT podľa typu metódy (napríklad RNA ngS, FISH) uvádza [Tabuľka 87](#).

Tabuľka 87 Doplnková klinická štúdia NTRK: Konkordancia medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódami LT pri detekcii fúzií NTRK podľa typu metódy LT

Typ metódy LT	Miera zhody	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI ¹
DNA NGS	PPA	84,2 (32/38)	(68,7, 94,0)
	NPA	88,9 (16/18)	(65,3, 98,6)
	OPA	85,7 (48/56)	(73,8, 93,6)
RNA NGS ²	PPA	91,5 (75/82)	(83,2, 96,5)
	NPA	96,9 (218/225)	(93,7, 98,7)
	OPA	95,4 (293/307)	(92,5, 97,5)
FISH	PPA	80,0 (8/10)	(44,4, 97,5)
	NPA	Nepočítané (1/1)	Nepočítané
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Nepočítané (0/0)	Nepočítané
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Nepočítané: pre podskupiny s počtom vzoriek < 5 neboli štatistické údaje o zhode počítané.

¹ Obojstranné 95 % intervaly CI boli počítané pomocou (presnej) Clopper-Pearsonovej metódy.

² Zahŕňa metódy NGS, ktoré využívajú iba RNA a DNA aj RNA.

Spomedzi 437 testovaných vzoriek pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) vykazovalo 24 z nich nesúhlasné výsledky s metódami LT: 15 bolo pozitívnych podľa metód LT a negatívnych podľa analýzy TSO Comprehensive (EU), a 9 bolo negatívnych podľa metód LT a pozitívnych podľa analýzy TSO Comprehensive (EU). Spomedzi 24 vzoriek s nesúhlasnými výsledkami bolo 8 testovaných pomocou metódy DNA NGS LT, 14 pomocou metódy RNA NGS LT a 2 pomocou metódy FISH.

Schválená nezávislá metóda NGS potvrdila výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) u 14 z 24 vzoriek s nesúhlasnými výsledkami. Pokiaľ ide o zvyšných 10 vzoriek, výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) boli nesúhlasné s metódou LT aj s nezávislou metódou NGS.

Výsledky klinickej účinnosti

V rámci kohorty ePAS4 bola účinnosť larotrectinibu v pozitívnej populácii podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a podľa LT (97 pacientov, ORR = 78,4 %, 95 % interval CI [68,8 %, 86,1 %]) podobná ako účinnosť larotrectinibu v celkovej populácii ePAS4 (164 pacientov, ORR = 72,6 %, 95 % interval CI [65,1 %, 79,2 %]) (Tabuľka 88). Spomedzi 97 pozitívnych pacientov podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) v kohorte ePAS4 dosiahlo 28 (28,9 %) pacientov úplnú liečebnú odpoveď/úplnú odpoveď na chirurgickú liečbu a 48 (49,5 %) pacientov dosiahlo čiastočnú liečebnú odpoveď.

Spomedzi 13 negatívnych pacientov podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a pozitívnych podľa metódy LT vykazoval 1 pacient (7,7 %) úplnú liečebnú odpoveď a 2 pacienti (15,4 %) vykazovali čiastočnú liečebnú odpoveď na larotrectinib.

Tabuľka 88 Doplnková klinická štúdia NTRK: ORR pacientov pozitívnych podľa metódy LT a analýzy TSO Comprehensive (EU) – výsledky v kohorte ePAS4

		Pozitívni na fúziu podľa metódy LT N=164	TSO Comprehensive (EU) Pozitívni a pozitívni podľa metódy LT N=97	TSO Comprehensive (EU) Negatívni a pozitívni podľa metódy LT N=13
Najlepšia celková liečebná odpoveď, n (%)	Úplná liečebná odpoveď	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Úplná odpoveď na chirurgickú liečbu	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Čiastočná liečebná odpoveď	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabilné ochorenie	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progresívne ochorenie	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Nemožné zhodnotiť	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)

		Pozitívni na fúziu podľa metódy LT N=164	TSO Comprehensive (EU) Pozitívni a pozitívni podľa metódy LT N=97	TSO Comprehensive (EU) Negatívni a pozitívni podľa metódy LT N=13
Celková miera odpovede	Počet pacientov, n	164	97	13
	Počet pacientov s CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR % (95 % CI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Skratky: CR = úplná liečebná odpoveď, PR = čiastočná liečebná odpoveď, sCR = úplná odpoveď na chirurgickú liečbu.

* Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti bol počítaný pomocou (presnej) Clopper-Pearsonovej metódy.

Pre 54 pacientov chýbali výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU).

Údaje z tejto štúdie potvrdzujú bezpečnosť a účinnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) pri identifikácii pacientov so solídnymi tumormi s fúziou NTRK, ktorí môžu spĺňať podmienky na liečbu larotrectinibom.

Referencie

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Accessed 3 October 2016.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Accessed 3 October 2016.

História revízií

Revízia	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 200007789 v08	Máj 2025	Odstránený odkaz na verzie softvéru a čísla dielov. Aktualizované obmedzenia postupu: • Informácie o nekrotickom tkanive. • Informácie o obsahu tumoru MSI. Aktualizované: • Poznámka pod čiarou pre NTC platí pre min. aj max. knižnice. • V časti Vybavenie a materiály sa uvádzajú špecifikácie centrifúgy pre doštičky a prírastky pre pipety. • Výpočet prebytku SPB od 1,05x do 1,15x. • Zmena terminológie z „Delécia MET exónu 14“ na „Vynechanie MET exónu 14“. Pridané: • Poznámka pre SMB v časti Prvé zachytenie cieľov a Druhé zachytenie cieľov. • Príprava na zavedenie sekvenovania. • Ďalšie informácie o ultrazvukovom prístroji. Pridané objasnenia a aktualizované výsledky pre časť Výkonnostné charakteristiky: • Interferujúce látky. • Presnosť pre profilovanie tumoru a platnosť vzoriek. • Limit detekčnej štúdie 1 a 2. • Štúdia presnosti v rámci laboratória 1. • Štúdia reprodukovateľnosti 2. • Informácie o stabilite knižníc a úložisku knižníc. • Limit blanku. Aktualizovaný jazyk a gramatika.

Revízia	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 200007789 v07	Január 2024	- Pridané informácie k obmedzeniam postupu: - Požiadavky na vzorky nekrotického tkaniva a obsahu tumoru pre mutácie s vysokým podielom MSI a mutácie somatického stimulačného faktora. - Potenciálna interferencia hemoglobínom. - Limity detekcie v géne RET a stanovenie fúzií mimo anotovaných hraníc génu. - Delécie génov nie sú hlásené. - Aktualizované na použitie so softvérom TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager verzie 2.3.7. - Pridané informácie k požadovanému, ale nedodanému vybaveniu a materiálom vrátane dvoch ďalších konfigurácií ultrazvukového prístroja. - Aktualizované informácie o vzorkách: - Obsah nekrotického tkaniva. - Účinky proteínázy K a hemoglobínu. - Uskladnenie tkaniva FFPE upevneného na sklíčko a purifikovanej nukleovej kyseliny. - Pridané informácie na zlepšenie manipulácie s reagensiami, pracovného postupu a riešenia problémov pri zlyhaní kontroly kvality chodu. - Pridaný kontext a zreteľnosť do časti Charakteristiky účinnosti: - Krížová kontaminácia - Hodnotenie súpravy na extrakciu nukleovej kyseliny - Interferujúce látky - Stabilita nukleovej kyseliny a tkaniva FFPE upevneného na sklíčko - Klinická účinnosť NTRK - Aktualizovaný jazyk a gramatika
Dokument č. 200007789 v06	Február 2023	- Ďalšie informácie v časti Obmedzenia - Jazykové aktualizácie (konvencie, gramatika a zreteľnosť textu) - Oprava tabuliek 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 - Informácie o prítomnosti zrazenín v reagentii FSM - Aktualizované špecifikácie termocykléra a žliabku v zozname Vybavenie a materiály
Dokument č. 200007789 v05	September 2022	Aktualizované tabuľky reprodukovateľnosti štúdie 2

Revízia	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 200007789 v04	Jún 2022	• Pridané čísla položiek analytického modulu TSO Comprehensive v2.3.5 • Odstránené čísla položiek analytického modulu TSO Comprehensive v2.3.3 • Aktualizovaná terminológia v časti Limit blanku
Dokument č. 200007789 v03	Apríl 2022	• Pridané charakteristiky účinnosti súvisiace s fúziami NTRK • Pridané označenie IBA NA EXPORT • Aktualizovaná časť s účelom určenia – pridanie predpokladu NTRK1-3 CDx • Rozšírené informácie o komponentoch produktu na zahrnutie čísel položiek softvérových komponentov
Dokument č. 200007789 v02	Február 2022	• Opravená chyba odkazu na tabuľku • Pridané obmedzenie súvisiace so zárodočnými a somatickými variantmi • Objasnené znenie textu o detekcii amplifikácie génov
Dokument č. 200007789 v01	December 2021	• Aktualizované obmedzenia postupu • Objasnené špecifikácie magnetického stojana a termocykléra v zoznamoch vybavenia a materiálov
Dokument č. 200007789 v00	November 2021	Úvodné vydanie

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním výrobku (výrobkov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument a jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovat akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu popísaného výrobku (výrobkov). Pred použitím takéhoto výrobku (výrobkov) je nutné prečítať si a pochopiť celý obsah tohto dokumentu.

NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH TU OBSIAHNUTÝCH POKYNOV A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE VÝROBKU (VÝROBKOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATEĽOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA VÝROBKOV (VÝROBKOVY).

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU POPÍSANÉHO VÝROBKU (VÝROBKOV) (VRÁTANE JEHO SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).

© 2025 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktné informácie



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



Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov pre vašu súpravu na stránke support.illumina.com na karte *Documentation* (Dokumentácia).