

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

Листовка

ЗА ИНВИТРО ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА. САМО ЗА ИЗНОС.

Предназначение

TruSight Oncology Comprehensive (EU) е *инвитро* диагностичен тест, който използва целево секвениране от следващо поколение за откриване на варианти в 517 гена с помощта на нуклеинови киселини, извлечени от фиксирани във формалин, вградени в парафин (FFPE) туморни тъканни проби от пациенти с рак със солидни злокачествени неоплазми, използвайки инструмент Illumina® NextSeq™ 550Dx. Тестът може да се използва за откриване на еднонуклеотидни варианти, многонуклеотидни варианти, инсерции, делеции и генни амплификации от DNA и генни сливания и RNA сплайс варианти. Тестът също така отчита оценка за туморен мутационен товар (Tumor Mutational Burden, TMB) и статус на микросателитна нестабилност (Microsatellite Instability, MSI).

Тестът е предназначен за съвместна диагностика за идентифициране на пациенти с рак за лечение с таргетната терапия, изброена в [Таблица 1](#), в съответствие с етикетирването на одобрения терапевтичен продукт. Освен това тестът е предназначен да предостави информация за профилиране на тумори за използване от квалифицирани здравни специалисти в съответствие с професионалните насоки и не е окончателен или нормативен за употреба на етикети на какъвто и да е специфичен терапевтичен продукт.

Таблица 1 Показание за съвместна диагностика

Тип тумор	Биомаркери	Таргетна терапия
Солидни тумори	NTRK1, NTRK2 и NTRK3 Генни сливания	VITRAKVI® (ларотректиниб)

Обобщение и обяснение на анализа

Клинично описание

Ракът е една от водещите причини за смърт в света и има способността да се зароди във всяка тъкан.¹ Анализът на генетичната база на тумора е важен за идентифициране на пациенти, които биха могли да се повлияят положително от целеви терапии, както и за разработване на нови методи за лечение. Множество гени участват в причиняването на тумори или тяхната прогресия и много тумори носят разнообразие от варианти, засягащи тези гени и техните функции. Тези варианти може да включват генни мутации, като еднонуклеотидни варианти (SNV), многонуклеотидни варианти (MNV), инсерции или делеции, генни амплификации, генни сливания и сплайс варианти. Друга последица от мутациите на туморния ген е появата на неоантигени, които предизвикват специфични за тумора реакции на имунната система. Мутиралата форма на тумора може да бъде изразена чрез TMB и MSI, които са геномни подписи, свързани с проявата на туморни неоантигени.

TruSight Oncology Comprehensive е тест за секвениране от следващо поколение (NGS) за изчерпателно геномно профилиране (CGP), който широкоспектърно оценява геномните варианти в голям панел от свързани с рак гени, изброени в Таблица 2. Анализът открива малки варианти в 517 гена, плюс генни амплификации, сливания и сплайс варианти, както е посочено в Таблица 2. Анализът осигурява покритие на кодираща секвенция за всички гени с изключение на TERT, където е покрит само промоторният регион, и оценява TMB резултата и MSI статуса. Тези цели на анализа включват съдържание, цитирано от професионални организации, като European Society for Medical Oncology (Европейско дружество за медицинска онкология, ESMO) и други важни американски ръководства.² Публикации на независими консорциуми и фармацевтични проучвания в напреднала фаза също са оказали влияние върху проекта на анализа TSO Comprehensive.

За списък на региони, които не са включени в обозначаването на варианти, вижте *TruSight Oncology Comprehensive Block List (Списък за блокиране на TruSight Oncology Comprehensive)* (документ № 200009524), наличен на сайта за поддръжка на Illumina. В някои файлове този списък за блокиране се нарича черен списък.

В Таблица 2 са идентифицирани четири категории варианти: Малък вариант на DNA (дезоксирибонуклеинова киселина) (S), генна амплификация (A), сливане (F) и сплайс вариант (Sp). Малки варианти на DNA включват SNV, MNV, инсерции и делеции.

Таблица 2 TSO Comprehensive (EU) Генен панел за анализ

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
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

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
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

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
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

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
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	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRF1	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

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
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	ZFH3	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	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо	He e приложимо

Принципи на процедурата

Анализът TSO Comprehensive (EU) е разпределен тест, който се извършва с помощта на извлечена нуклеинова киселина като входен материал. DNA и/или RNA, извлечена от FFPE тъкан, се използва за изготвяне на библиотеки, които след това се обогатяват за гени, свързани с тумори и се секвенират на инструмента Инструмент NextSeq 550Dx.

Анализът TSO Comprehensive (EU) включва следните процеси.

- **Приготвяне и обогатяване на библиотеки** – за RNA, 40 ng общо се превръща в двойноверижна допълнителна DNA (cDNA). За геномна DNA (gDNA), 40 ng gDNA се срязва на малки фрагменти. Универсалните адаптери за секвениране се лигират върху фрагментите на cDNA и gDNA. Във всяка библиотека се включват индексни секвенции P5 и P7, за да се даде възможност за улавяне на библиотечните фрагменти върху повърхността на поточната клетка по време на секвенирането. Индексите включват уникална секвенция за идентифициране на всяка отделна проба, а в случай на библиотеки от gDNA проби – на отделни молекули с помощта на уникални молекулярни идентификатори (UMI, Unique Molecular Identifiers). След това библиотеките се обогатяват за специфичните гени, които представляват интерес, като се използва метод на улавяне. Към библиотеките се хибридизират биотинилирани секвенции на сонди, които обхващат регионите на гените, представляващи интерес и цел на анализа. Сондите и хибридизираните целеви библиотеки се изолират от нецелевите библиотеки чрез улавяне със стрептавидинови магнитни частици. Обогатените целеви библиотеки се промиват и амплифицират. След това количеството на всяка обогатена библиотека се нормализира, като се използва метод въз основа на топчета, за да се осигури еднакво представяне в пулираните библиотеки за секвениране.
- **Секвениране и първичен анализ** – нормализираните, обогатени библиотеки се пулират и групират върху поточна клетка, след което се секвенират, като се използва химичен метод за секвениране чрез синтез (SBS, sequencing by synthesis) на NextSeq 550Dx. SBS химията използва метод с обратим терминатор за откриване на единични, белязани флуоресцентно бази с дезоксинуклеотид трифосфат (dNTP), тъй като те са включени в нарастващи DNA вериги. По време на всеки цикъл на секвениране към веригата от нуклеинови киселини се добавя единичен dNTP. dNTP маркерът служи като терминатор на полимеризацията. След всяко инкорпориране на dNTP се създава образ на флуоресцентното багрило, за да се идентифицира базата, след което се отстранява, за да се позволи инкорпориране в следващия нуклеотид. Четирите dNTP, свързани с обратими терминатори (A, G, T и C), представляват единични, отделни молекули. В резултат на това естествената конкуренция свежда до минимум едностранчивостта на инкорпорирането. По време на първичния анализ обозначаванията на бази се извършват директно от измерванията на интензитета на сигнала по време на всеки цикъл на секвениране, в резултат на което се секвенира база по база. Резултат за качеството се задава на всяко обозначаване на база.
- **Вторичен анализ** – Модулът Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager се намира в инструмента NextSeq 550Dx като част от софтуера Local Run Manager (LRM), за да се улесни настройката за изпълняване на TSO Comprehensive (EU) и да се извърши вторичен

анализ на резултатите от секвенирането. Вторичният анализ включва валидиране на изпълняването и контрол на качеството, последван от демултиплексиране, генериране на FASTQ файлове, подравняване и обозначаване на варианти. Демултиплексирането разделя данните в пулирани библиотеки въз основа на уникалните индекси за секвениране, които са добавени по време на процедурата по приготвяне на библиотеките. Създават се FASTQ междинни файлове, които съдържат разчитания на секвенции за всяка проба и резултати за качеството, с изключение на разчитания от клъстери, които не са преминали през филтъра. След това разчитанията на секвенции се подравняват спрямо референтен геном, за да се идентифицира връзката между секвенциите, и им се задава резултат въз основа на регионите със сходство. Подравнените разчитания се записват във файлове във формат BAM. Софтуерът за анализ използва отделни алгоритми за библиотеки, генерирани от DNA и/или RNA проби, за да обозначи малки варианти на DNA, генни амплификации, TMB и MSI за DNA проби, както и сливания и сплайс варианти за RNA проби. Софтуерният модул за анализ генерира множество изходни данни, включително показатели за секвениране и файлове с формат на обозначаване на варианта (VCF, Variant Call Format). Файловете VCF съдържат информация относно варианти, открити на конкретни позиции в референтен геном. За всяка проба се генерират показатели за секвениране и индивидуални изходни файлове. Вижте Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661) за подробности относно вторичния и третичния анализ.

- **Третичен анализ** – Третичният анализ, изпълняван от Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager, се състои от изчисления на TMB и MSI, обозначаване на съвместна диагностика, профилиране на туморни варианти в две нива на клинична значимост, като се използва база знания (БЗ) и типът тъкан, и генериране на отчет за резултатите. Профилирането на тумора още се нарича цялостно геномно профилиране. Резултатите от интерпретираните варианти, както и резултатите от биомаркерите TMB и MSI, се обобщават в отчета за резултатите от TSO Comprehensive (EU).

Ограничения на процедурата

Само за *инвитро* диагностична употреба.

- Само по предписание. Тестът трябва да се прилага в съответствие с правилата на клиничната лаборатория.
- Геномните находки, изброени в [Таблица 2](#) на раздел Предназначение, не са предписателни или решаващи за еталонна употреба на всеки конкретен терапевтичен продукт.
- За вариантите, изброени в отчета за резултатите от TSO Comprehensive (EU) в раздела Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance (Геномни находки с доказателство за клинично значение) и Genomic Findings with Potential Clinical Significance (Геномни находки с потенциално клинично значение), не е извършено клинично валидиране.

- Решенията относно грижите за пациента и лечението на пациента трябва да се основават на независимата медицинска преценка на лекуващия лекар, като се вземе предвид цялата приложима информация относно състоянието на пациента, като анамнеза на пациента, фамилна анамнеза, физикални изследвания, информация от други диагностични тестове и предпочитанията на пациента, съгласно стандарта за грижи в съответната общност.
- Качеството на FFPE пробите е много променливо. Проби, които не са преминали през стандартни процедури за фиксиране, може да не генерират извлечени нуклеинови киселини, които да отговарят на изискванията за контрол на качеството на анализа (*Качествен контрол на страница 85*). FFPE блоковете, които са съхранявани в продължение на повече от пет години, показват по-ниска валидност.
- Не е оценена ефективността на TSO Comprehensive (EU) в проби, получени от пациенти, на които е извършена трансплантация на органи или тъкани.
- При силно пренаредени геноми с делеции и загуба на хетерозиготност софтуерът TSO Comprehensive (EU) може погрешно да класифицира DNA проба като замърсена (CONTAMINATION_SCORE > 3106 и p-стойност > 0,049).
- Получаването на отрицателен резултат не изключва наличието на мутация под границите на откриване (LoD) на анализа.
- Чувствителността за откриване на малки варианти на DNA може да бъде повлияна от:
 - Геномен контекст с ниска сложност
 - Нарастваща дължина на вариант
- Оценките на TMB могат да бъдат неточни в следните случаи:
 - Когато съдържанието на тумор стигне нива, в които честотите на вариантните алели (VAF) от герминативната линия и на соматичните вариантни алели се приближават.
 - При популации, които не са добре представени в публичните бази данни.
- Чувствителността за откриване на сливания може да бъде повлияна в следните случаи:
 - При ниска сложност на библиотеката, което води до намаляване на поддържащите разчитания поради отклонения в работния процес на анализа (например следвайте стъпките за смесване в *Денатуриране и отгряване на RNA на страница 47*).
 - Когато един ген обхваща и двете точки на прекъсване.
 - В случаите, когато няколко точки на прекъсване на сливането са в непосредствена близост една до друга с един или няколко партньора; множеството точки на прекъсване и партньори могат да бъдат отчетени като една точка на прекъсване и един партньор.
 - При малки медианни размери на въвеждане; изисква се минимален медианен размер на въвеждане от 80 bp, но чувствителността намалява в диапазона 80 – 100 bp.
 - При ниска сложност на секвенцията или хомоложен геномен контекст около точките на сливане.

- Разпознаването на гените, участващи в сливането, може да бъде повлияно, когато точките на сливане са в геномни региони, съдържащи припокриващи се гени. Анализът ще отчете всички гени, изписани разделно с точка и запетая, ако няколко гена се припокриват в точката на прекъсване.
- Покриване без съответствие в региона на промотора на TERT може да доведе до No Result (липса на резултат) поради ниска дълбочина.
- Грешки в анотацията или БЗ могат да доведат до фалшиво положителен или фалшиво отрицателен резултат, включително да се изпише вариант в грешно ниво (между Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance [Геномни находки с доказателство за клинична значимост] и Genomic Findings with Potential Clinical Significance [Геномни находки с потенциална клинична значимост]), или информацията за анотацията в отчета да е неправилна. Възможно е грешката да възникне от следните три източника:
 - Анотация на вариант TSO Comprehensive (EU). Въз основа на анализ на 2 448 350 варианта от COSMIC v92 процентът на грешките е приблизително 0,0027%, следователно вероятността за грешка е малка.
 - Грешка в БЗ, дължаща се на процеса на куриране или подреждане.
 - Уместността на съдържанието на БЗ се променя с течение на времето. Отчетът ще отразява знанията по времето, когато версията на БЗ е била курирана.
 - Вариантите, отчетени в резултатите от CDx, не се влияят от анотации или грешки в БЗ.
- TSO Comprehensive (EU) е създаден за отчитане на соматични варианти, когато се отчитат варианти с доказателство за клинично значение или варианти с потенциално клинично значение. Като тест само за тумор, отчитането на варианти на герминативни (наследени) линии е възможно, но неволно. TSO Comprehensive (EU) използва БЗ за отчитане на варианти, без изрично да се посочва дали са от герминативен или соматичен произход.
- БЗ включва терапевтични, диагностични и прогнозни асоциации, които са относими към варианти, налични в установена солидна злокачествена неоплазма. Асоциациите за предразположеност към или риск от рак не са включени в БЗ.

Компоненти на продукта

Тестът TruSight Oncology Comprehensive (EU) се състои от следните компоненти:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) комплект (Illumina каталожен № 20063092): Комплектът включва реагенти с достатъчен обем за генериране на 24 библиотеки с DNA и 24 библиотеки с RNA (рибонуклеинова киселина) с контроли, които включват проби и контроли от пациенти. Контролите се продават отделно (вижте [Необходими реагенти, които не са предоставени на страница 18](#)).
- Познавателна база: Актуализира се редовно и е на разположение за изтегляне от портала Illumina Lighthouse.
- Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (Illumina каталожен № 20051843*), който включва следните компоненти и поддържа профилиране на тумори и NTRK:

- Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.1.0 (част № 20079589)
- TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 Software Suite (част № 20079588)
- TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 USB Kit (част № 20079591)
- Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (Illumina каталожен № 20051843*), който включва следните компоненти и поддържа профилиране на тумори и NTRK:
 - Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.0.0 (част № 20051760)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 Software Suite (част № 20075244)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 USB Kit (част № 20075239)

* Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager: Сервизен представител на Illumina инсталира подходящата версия на Модул за анализ TSO Comprehensive (EU) на Local Run Manager Инструмент NextSeq 550Dx. Вижте [Таблица 3](#) за Ръководството за работния процес и версията на софтуера на модула за анализ.

Таблица 3 Ръководство за работния процес и версия на софтуера на модула за анализ TSO Comprehensive

Ръководство за работния процес	Тъкан	Версия на софтуера на TSO Comprehensive
200008661	FFPE	v2.3.5 или v2.3.6

Реагенти

Предоставени реагенти

Следните реагенти се доставят с комплекта за анализ TSO Comprehensive (EU).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, част № 20031127

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли и нуклеотиди	-25°C до -15°C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли, DNA полимераза, RNase H и нуклеотиди	-25°C до -15°C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли и произволни хексамери	-25°C до -15°C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ обратна транскриптаза	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), част № 20031118

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ T4 DNA полимераза и полинуклеотид киназа	-25°C до -15°C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли и нуклеотиди	-25°C до -15°C

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	-25°C до -15°C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ лигаза	-25°C до -15°C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ универсални секвениращи олигонуклеотиди	-25°C до -15°C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ универсални секвениращи олигонуклеотиди	-25°C до -15°C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	-25°C до -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Буфериран воден разтвор, съдържаща DNA полимераза и нуклеотиди	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), част № 20031119

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	2°C до 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Воден разтвор, съдържащ магнитни топчета	2°C до 8°C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA разтвор	2°C до 8°C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, част № 20031120

Активни съставки: Буфериран воден разтвор, съдържащ индивидуално баркодирани олигонуклеотидни праймери.

Забележка Използвайте уникални индексни праймери (Unique Index Primers, UPxx) за проби от RNA или DNA.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, част № 20031126

Активни съставки: Буфериран воден разтвор, съдържащ индивидуално баркодирани олигонуклеотидни праймери.

**ВНИМАНИЕ**

Използвайте комбинаторни индексни праймери (Combinatorial Index Primers, CPxx) само за проби от DNA (FFPE работен процес).

Индексен праймер	Номер на част	Количество	Обем	Индекс i7	Секвениране	Индекс i5	Секвениране	Температура на съхранение
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C

Индексен праймер	Номер на част	Количество	Обем	Индекс i7	Секвениране	Индекс i5	Секвениране	Температура на съхранение
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), част № 20031123

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ формаמיד и соли	2°C до 8°C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли и твърдофазни парамагнитни топчета, ковалентно покрити със стрептавидин	2°C до 8°C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Разтвор на натриев хидроксид	2°C до 8°C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Буфериран воден разтвор	2°C до 8°C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ твърдофазни парамагнитни топчета	2°C до 8°C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли, 2-меркаптоетанол и формаמיד	2°C до 8°C

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	2°C до 8°C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	2°C до 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Воден разтвор, съдържащ магнитни топчета	2°C до 8°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), част № 20031121

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ олигонуклеотиди	-25°C до -15°C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	-25°C до -15°C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ препарат	-25°C до -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Буфериран воден разтвор, съдържаща DNA полимераза и нуклеотиди	-25°C до -15°C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ праймери P5 и P7	-25°C до -15°C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли, 2-меркаптоетанол и формамид	-25°C до -15°C
PhiX Internal Control (PX3 или PhiX)	20031492	1	10 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ PhiX геномна DNA	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Content Set, част № 20031122

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Пул от олигонуклеотидни сонди	-25°C до -15°C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Пул от олигонуклеотидни сонди	-25°C до -15°C

Необходими реагенти, които не са предоставени**Предамплификационни реагенти**

- Реагенти за извличане и пречистване на DNA и RNA – Вижте [Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27](#) за изискванията към реагентите.
- Реагенти за количествено определяне на DNA и RNA – Вижте [Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27](#) за изискванията към реагентите.
- TruSight Oncology DNA контрола (Illumina каталожен № 20065041)
- TruSight Oncology RNA контрола (Illumina каталожен № 20065042)
- Етанол, 100% (200 proof), молекулярно-биологичен клас
- Вода без RNase/DNase

Следамплификационни реагенти

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina каталожен № 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- Етанол, 100% (200 proof), молекулярно-биологичен клас
- Вода без RNase/DNase

Съхранение и обработка на реагенти

- Следните кутии с реагенти се изпращат замразени. Съхранявайте при температура от -25°C до -15°C.

Кутия	Номер на част	Лабораторна зона
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Преди амплификация
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Преди амплификация
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Преди амплификация
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Преди амплификация
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	След амплификация
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	След амплификация



ВНИМАНИЕ

Не съхранявайте реагенти в модул за съхранение без замръзване или в отделения на вратата на хладилника.

- Следните кутии с реагенти се доставят в опаковки с гел за поддържане на температура от 0°C до 10°C. Съхранявайте при температура от 2°C до 8°C.

Кутия	Номер на част	Лабораторна зона
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Преди амплификация
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	След амплификация



ВНИМАНИЕ

Не замразявайте реагенти, съдържащи топчета (LNB1, SPB и SMB).

- Промените във физическия вид на реагентите могат да показват влошаване на качеството на материалите. Ако настъпят промени във физическия вид (напр. промени в цвета на реагента или помътняване), не използвайте реагентите.

- Стабилността на анализа TSO Comprehensive (EU) е оценена и е демонстрирана производителност за до четири употреби на комплекта. Реагентите са стабилни, когато се съхраняват при посочените температури до посочения срок на годност върху етикета на кутията.

Оборудване и материали

Необходимо оборудване и материали, които не са предоставени

Предамплификационно оборудване и материали

Оборудване	Доставчик
Ултразвуков апарат със свързани аксесоари Вижте Оптимизиране на ултразвукови апарати за фрагментиране на DNA на страница 25.	Общ лабораторен доставчик
Термоциклер със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> • Нагревателен капак, който може да се настрои на 30°C и 100°C (или да се изключи, ако няма възможност за 30°C) • Обхваща температурен диапазон от 4°C до 99°C • ±0,25°C температурна точност • Съвместим с 96-ямкови PCR плаки, 0,2 ml (полипропилен) • Вижте Скорост на изменение на термоциклера на страница 26 	Общ лабораторен доставчик
Завихрящ миксер	Общ лабораторен доставчик
Инкубатори за микропроби (2) с вложки за 96-ямкови MIDI плаки (2)	Общ лабораторен доставчик
Микроцентрифуга	Общ лабораторен доставчик
Центрофугиране (центрофугиране на плака) със следните възможности: <ul style="list-style-type: none"> • Центрофугиране на 96-ямкови микроплаки • Възможност за 280 × g 	Общ лабораторен доставчик
Съд за разбъркване за плака със следните възможности: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm орбита • Може да разбърква при 1200 об./мин и 1800 об./мин 	Общ лабораторен доставчик
Уплътнителен клин или валеж	Общ лабораторен доставчик
Магнитна стойка със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> • Проектирана за утаяване/отделяне на парамагнитни топчета • Магнити отстрани на стойката, а не отдолу • За 96-ямкови MIDI плаки 	Общ лабораторен доставчик

Оборудване	Доставчик
Прецизни пипети <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl едно- или многоканални пипети • 200 µl едно- или многоканални пипети • 1000 µl едно- или многоканални пипети Които отговарят на следните изисквания: <ul style="list-style-type: none"> • Калибрирани редовно, с 5% точност. 	Общ лабораторен доставчик
Помощ за пипета	Общ лабораторен доставчик
Серологични пипети от 10 ml	Общ лабораторен доставчик
Залепващи уплътнения за 96-ямкови плаки със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> • Отлепващ се, оптически прозрачен полиестер • Подходящи за закрити или полузакрити PCR плаки • Силно лепило, което издържа многократни температурни промени от -40°C до 110°C • Без DNase/RNase 	Общ лабораторен доставчик
Епруветки за микроцентрифугиране, без нуклеаза, 1,7 ml	Общ лабораторен доставчик
Резервоари за реактиви без нуклеаза (PVC, ваничка за еднократна употреба, 50 ml) (или еквивалент)	Общ лабораторен доставчик
Конусовидни епруветки 15 ml	Общ лабораторен доставчик
Конусовидни епруветки 50 ml	Общ лабораторен доставчик
Накрайници за пипети с устойчивост на аерозоли 20 µl	Общ лабораторен доставчик
Накрайници за пипети с устойчивост на аерозоли 200 µl	Общ лабораторен доставчик
Накрайници за пипети с устойчивост на аерозоли 1000 µl	Общ лабораторен доставчик
96-ямкови плаки за съхранение, 0,8 ml (MIDI плаки)	Fisher Scientific, част № AB-0859 или еквивалентна
96-ямкови PCR плаки, 0,2 ml (полипропилен)	Общ лабораторен доставчик

Следамплификационно оборудване и материали

Оборудване	Доставчик
Инструмент NextSeq 550Dx	Illumina, каталожен № 20005715
Центрофугиране (центрофугиране на плака) със следните възможности: <ul style="list-style-type: none"> • Центрофугиране на 96-ямкови микроплаки • Възможност за 280 × g 	Общ лабораторен доставчик
Термоциклер със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> • Нагревателен капак (100°C) • Обхваща температурен диапазон от 4°C до 99°C • ±0,25°C температурна точност • Съвместим с 96-ямкови PCR плаки, 0,2 ml (полипропилен) • Вижте Скорост на изменение на термоциклера на страница 26 	Общ лабораторен доставчик
Завихрящ миксер	Общ лабораторен доставчик
Инкубатор за микропроби с вложка за 96-ямкови MIDI плаки	Общ лабораторен доставчик
Сух топлинен блок със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> • Температурен диапазон от 25°C до 99°C • ±5°C температурна точност • Уверете се, че епруветките за микроцентрофугиране са съвместими с топлинния блок 	Общ лабораторен доставчик
Съд за разбъркване за плака със следните възможности: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm орбита • Може да разбърква при 1200 об./мин и 1800 об./мин 	Общ лабораторен доставчик
Микроцентрофуга	Общ лабораторен доставчик
Уплътнителен клин или валяк	Общ лабораторен доставчик
Магнитна стойка със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> • Проектирана за утаяване/отделяне на парамагнитни топчета • Магнити отстрани на стойката, а не отдолу • За 96-ямкови MIDI плаки 	Общ лабораторен доставчик

Оборудване	Доставчик
Прецизни пипети <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl едно- или многоканални пипети • 200 µl едно- или многоканални пипети • 1000 µl едно- или многоканални пипети Които отговарят на следните изисквания: <ul style="list-style-type: none"> • Калибрирани редовно, с 5% точност. 	Общ лабораторен доставчик
Помощ за пипета	Общ лабораторен доставчик
Серологични пипети от 10 ml	Общ лабораторен доставчик
Залепващи уплътнения за 96-ямкови плаки със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> • Отлепващ се, оптически прозрачен полиестер • Подходящи за закрити или полузакрити PCR плаки • Силно лепило, което издържа многократни температурни промени от -40°C до 110°C • Без DNase/RNase 	Общ лабораторен доставчик
Епруветки за микроцентрифугиране, без нуклеаза	Общ лабораторен доставчик
Резервоари за реактиви без нуклеаза (PVC, ваничка за еднократна употреба, 50 ml) (или еквивалент)	Общ лабораторен доставчик
Конусовидни епруветки 15 ml	Общ лабораторен доставчик
Конусовидни епруветки 50 ml	Общ лабораторен доставчик
Накрайници за пипети с устойчивост на аерозоли 20 µl	Общ лабораторен доставчик
Накрайници за пипети с устойчивост на аерозоли 200 µl	Общ лабораторен доставчик
Накрайници за пипети с устойчивост на аерозоли 1000 µl	Общ лабораторен доставчик
96-ямкови плаки за съхранение, 0,8 ml (MIDI плаки)	Fisher Scientific, част № AB-0859 или еквивалентна
96-ямкови PCR плаки, 0,2 ml (полипропилен)	Общ лабораторен доставчик

Оптимизиране на ултразвукови апарати за фрагментиране на DNA

DNA фрагментацията или срязването влияе на ефективността на анализа, като определя разпределението на размера на фрагмента, което от своя страна влияе върху покритието на секвенирането. Няколко конфигурации за фокусирана ултразвукова обработка бяха оценени и оптимизирани за TSO Comprehensive (EU) анализа ([Таблица 4](#)). Времето за срязване беше коригирано, за да се увеличи максимално показателят MEDIAN_EXON_COVERAGE, очертан в [Качествен контрол на страница 85](#). Времената на срязване (с удебелен шрифт в [Таблица 4](#)) се различаваха в различните конфигурации, както и резултатите от MEDIAN_INSERT_SIZE. Всичките три конфигурации бяха тествани с 8-лентови епруветки; използваните обеми са показани в [Таблица 4](#).

Оптимизация на конфигурация 3 (точков преобразувател, недегазирана вода, малък обем на водна баня) използва пулсиране и има най-краткото време на срязване, което води до малко по-голямо разпределение на размера на фрагмента в сравнение с другите две конфигурации (MEDIAN_INSERT_SIZE беше приблизително с 5 – 10 базови двойки по-голям). Освен това конфигурация 3 се нуждаеше от увеличен вход на DNA (50 ng), за да постигне подобен MEDIAN_EXON_COVERAGE спрямо другите две конфигурации, които използваха номиналния вход от 40 ng. Конфигурация 3 има повече повреди и/или денатурация и следователно намалена ефективна маса на използваемите dsDNA молекули за приготвяне на библиотеката.

Центрофугирайте епруветките за срязване по време на процеса на възстановяване, за да се гарантира, че определеният обем е извлечен, тъй като всяка загуба на материал може да повлияе неблагоприятно на производителността.

Таблица 4 Оценени конфигурации на фокусиран ултразвуков апарат

Параметър	Конфигурация		
	1	2	3
Трансдюсер	Линия	Точка	Точка
Обем на водна баня	5 L	5 L	85 ml
Дегазирана вода	Да	Да	Не
Охладител за вода	Да	Да	Да
Температура на водна баня	7°C	7°C	12°C
Пикова мощност на инцидента (PIP)	450 W	175 W	50 W
% Фактор на избухване	30	10	30
Цикли на избухване	200	200	1000
Пулсиране (избухвания от 10 секунди)	Не	Не	Да
Време за рязане	250 сек	280 сек	200 сек*
Обработка на проби	1 – 8	1	1
Размер на партидата	1 – 96	1 – 96	1 – 8
Размер на пробата от стъклена 8-лентова епруветка	130 µ	130 µ	50 µl
Еквивалент на вход на DNA (за средно покритие на екзона)	40 ng	40 ng	50 ng

* Времето за рязане от 200 секунди се състои от избухвания от по 10 секунди с 20 повторения.

Скорост на изменение на термоциклера

Скоростта на изменение на термоциклера влияе върху анализа на показателите за КК – използваеми MSI места, среден брой целеви бинове CNV, среден размер на въвеждане (RNA) – както и върху поддържащите разчитания за сплайс варианти и сливания. Препоръчва се оптимизиране на скоростта на изменение на термоциклера. Например тестваният модел е регулиран от скорост по подразбиране (и максимална) на рампата от 5 градуса C/s до 3 градуса C/s, за да се получат сравними резултати с други модели с по-ниски скорости на рампата по подразбиране.

Събиране, транспортиране и съхранение на спесимени

Следвайте стандартната процедура при събиране, транспортиране, съхранение и обработка на пробите.

Изисквания за пробите

FFPE тъкан

Анализът TSO Comprehensive (EU) изисква 40 ng RNA и/или 40 ng DNA, извлечени от FFPE тъкан. Използването на RNA и DNA позволява анализ на всички искани типове варианти. Тъканта трябва да се фиксира с помощта на формалинов фиксатор, подходящ за молекулярни анализи (например 10% неутрален буфериран формалин). Тъканта не може да бъде декалцирана. Преди да извършите анализа TSO Comprehensive (EU), тъканната проба трябва да бъде изследвана от патолог, за да се гарантира, че е подходяща за този тест. За откриване на соматични мутации е необходимо минимум 20% туморно съдържание (по площ). За откриване на високи MSI е необходимо минимум 30% туморно съдържание. Туморното съдържание за генни амплификации и варианти на RNA зависи от степента на амплификация или експресия на сливане (вижте [Туморно съдържание на страница 109](#)).

За голяма вероятност за извличане на 40 ng RNA и 40 ng DNA от различни типове твърди тъкани, препоръчителният обем на тъканта е $\geq 1,0 \text{ mm}^3$, което е еквивалентно на кумулативна жизнеспособна тъканна площ от $\geq 200 \text{ mm}^2$ при използване на срезове с дебелина 5 μm , или $\geq 100 \text{ mm}^2$, като се използват участъци с дебелина 10 μm . Кумулативната тъканна площ е сумата от площта на жизнеспособната тъкан във всички участъци, предоставени за извличане. Например кумулативна тъканна площ от 200 mm^2 може да бъде получена чрез извличане на четири 5 μm участъка с 50 mm^2 тъканна площ за всеки от тях или пет 10 μm участъка с 20 mm^2 тъканна площ за всеки от тях. Некрозата на тъканите може да намали количеството на добива на нуклеинова киселина. За да се сведе до минимум възможността за фалшиво отрицателни резултати, тъканта може да бъде макродисектирана, за да се постигне желаното жизнеспособно туморно съдържание.

Голямо количество некротична тъкан ($\geq 25\%$) може да попречи на способността на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на генни амплификации и сливания на RNA.

Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение

- Извлечете RNA и DNA от FFPE тъканните проби с помощта на наличните в търговската мрежа комплекти за извличане. Разликите в комплектите за извличане може да окажат влияние върху изпълнението. Вижте [Оценка на комплект за извличане на нуклеинова киселина на страница 99](#).

- Съхранявайте извлечената налична нуклеинова киселина, като спазвате инструкциите от производителя на комплектите за извличане.
- За да избегнете промени в концентрацията с течение на времето, измерете DNA и RNA непосредствено преди да започнете приготвянето на библиотеките. Определете количествено RNA и DNA с помощта на флуорометричен метод за количествено определяне, който използва багрила, свързващи нуклеиновата киселина. Концентрацията на нуклеинова киселина трябва да бъде средната стойност от поне три измервания.
- Анализът изисква 40 ng от всяка RNA проба, приготвени във вода без-RNase/DNase (не е предоставена), с краен обем от 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Анализът изисква 40 ng от всяка gDNA проба с минимална концентрация на екстракция от 3,33 ng/µl. Срязването изисква краен обем от 52 µl (0,77 ng/µl) с минимум 40 µl ТЕВ (предоставен), използван като разреждател.

Съхранение на библиотеки

Съхранявайте библиотеки в PCR плаки с ниско свързване за 7 до 30 дни, в зависимост от типа библиотека (вижте [Таблица 5](#)).

Таблица 5 Време за съхранение на библиотеки

Тип библиотека	Плака	Брой дни	Температура на съхранение
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25°C до -15°C
Фрагментирана gDNA	LP PCR	≤ 7	-25°C до -15°C
Преди обогатяване	ALS PCR	≤ 30	-25°C до -15°C
След обогатяване	ELU2 PCR	≤ 7	-25°C до -15°C
PCR след обогатяване	PL PCR	≤ 30	-25°C до -15°C
Нормализиран	NL PCR	≤ 30	-25°C до -15°C

Предупреждения и предпазни мерки

Безопасност

1. Някои компоненти на този анализ съдържат потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реагенти като химичен отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За информационните листове за безопасност (SDS) посетете адрес support.illumina.com/sds.html.
2. Работете с всички спесимени така, сякаш е известно, че са инфекциозни.
3. Използвайте обичайните лабораторни предпазни мерки. Не пипетирайте с уста. Не яжте, не пийте и не пушете в определените работни зони. Носете ръкавици за еднократна употреба и лабораторни престилки при работа с проби и реагенти за анализ. Измивайте внимателно ръцете си след работа с проби и реагенти за анализ.

Лаборатория

1. За да предотвратите замърсяване, организирайте в лабораторията еднопосочен работен поток. Зоните преди и след амплификация трябва да разполагат със специално оборудване и материали (например пипети, крайници за пипети, завихрящ миксер и центрофуга). За да предотвратите пренасянето на продукт на амплификация или на сонда, избягвайте връщането в зоната преди амплификация, след като влезете в зоната след амплификация.
2. Изпълнете стъпките за Индекс на PCR и обогатяване в зона след амплификация, за да предотвратите пренасяне на продукта от амплификация.
3. Процедурите за приготвяне на библиотеката изискват среда без RNase/DNase. Старателно отстранете замърсяването от работните зони с RNase/DNase инхибиращ почистващ препарат. Използвайте сертифицирани пластмаси, които не съдържат DNase, RNase и човешка геномна DNA.
4. За процедури след амплификация почиствайте добре работните повърхности и оборудването преди и след всяка процедура с прясно приготвен 0,5% разтвор на натриев хипохлорит (NaOCl). Оставете разтвора да влезе в контакт с повърхностите за 10 минути и след това избършете добре със 70% етилов или изопропилов алкохол.
5. Използвайте епруветки за микроцентрофугиране, плаки, крайници на пипети и резервоари без нуклеаза.
6. Използвайте калибрирано оборудване по време на целия анализ. Не забравяйте да калибрирате оборудването за скоростите, температурите и обемите, посочени в този протокол.

7. Използвайте прецизни пипети, за да се гарантира прецизното доставяне на реагенти и проби. Калибрирайте редовно според спецификациите на производителя.
8. Използвайте следните указания при употребата на многоканални пипети:
 - Пипетирайте минимум $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Уверете се, че накрайниците на преградата са добре прилепнали и подходящи за марката и модела на многоканалната пипета.
 - Прикрепете накрайниците с въртеливо движение, за да е сигурно, че всички накрайници се прикрепят еднакво добре.
 - Аспирирайте под ъгъл от 90° с равни нива на обем на течността във всички накрайници.
 - Смесете всички компоненти след доставката, като пипетирате реакционната смес нагоре и надолу.
 - След дозиране се уверете, че течността е отделена от всеки накрайник.
9. Уверете се, че използвате оборудването, определено за анализа, и задайте програмите според указанията.
10. Посочените температури за термоциклера и инкубатора за микропроби показват температурата на реакцията, а не непременно зададената температура на оборудването.

Анализ

1. Избягвайте кръстосано замърсяване.
 - Спазвайте правилните лабораторни практики при работа с проби и реагенти.
 - Използвайте нови консумативи за лабораторното оборудване и нови накрайници за пипети за отделните проби и дозираня на реагенти.
 - Използвайте устойчиви на аерозоли накрайници за намаляване на риска от кръстосано замърсяване.
 - Използвайте еднопосочен работен поток, когато преминавате от зони преди амплификация към зони след амплификация.
 - Работете с един и отваряйте само един индексен праймер в даден момент. Затворете отново всяка индексна епруветка веднага след употреба. В комплекта са предоставени допълнителни капачки.
 - Сменяйте ръкавиците често и при контакт с индексни праймери или проби.
 - Отстранете неизползваните епруветки с индексен праймер от работната зона.
 - Не връщайте реагентите в епруветките за съхранение след употреба с лентова епруветка, ваничка или резервоар.
 - Смесете пробите с пипета и центрофугирайте плаката, когато е указано.
 - Използвайте уред за разбъркване на микроплаки. Не вортексирайте плаките.

2. Не разменяйте компоненти на анализи от различни партии на комплекти с реагенти. Партидите на комплекти с реагенти са идентифицирани на етикета на кутията с комплекти на реагенти и листа на основната партида.
3. Необходими са подходящи лабораторни практики, за да се предотврати замърсяването от нуклеазите и продуктите от PCR върху реагенти, апаратура, проби и библиотеки. Замърсяването на нуклеазата и продуктите от PCR може да доведе до неточни и ненадеждни резултати.
4. Необходим е подходящ тип плака за оптимално изпълнение на анализа и съхранение. Уверете се, че следвате инструкциите за прехвърляне на плаки в [Инструкции за употреба на страница 41](#).
5. Неспазването на описаните процедури може да доведе до грешни резултати или до значително влошаване на качеството на библиотеката.
6. Освен ако в [Инструкции за употреба на страница 41](#) не е посочена безопасна точка на спиране, продължете незабавно със следващата стъпка.
7. Съхранявайте реагентите или компонентите на анализа при указаната температура и в определената преди амплификационна или след амплификационна зона.
8. Не съхранявайте реагенти в модул за съхранение без замръзване или в отделения на вратата на хладилника.
9. Не замразявайте реагенти, съдържащи топчета (LNB1, SPB и SMB).
10. Не използвайте реагенти, които са били съхранявани неправилно.
11. Не се отклонявайте от процедурите за смесване и обработка, посочени за всеки реагент. Неподходящото смесване или прекомерното вортексиране на реагентите може да доведе до неуспешни резултати от пробата.
12. Пригответе нови основни смеси и изхвърлете останалия обем след употреба.
13. Задължително пригответе пресен 80% етанол с вода без RNase/DNase за стъпките за измиване. Етанолът може да абсорбира влага от въздуха, което може да повлияе на резултатите. Изхвърлете 80% етанол след употреба в съответствие с местните, държавни и/или федерални разпоредби.
14. Прехвърлете посочения обем елуат. Прехвърлянето на по-малко от посочения обем елуат по време на етапите на елуиране може да повлияе на резултатите.
15. Използвайте следните указания за ултразвукови апарати. Уверете се, че следвате инструкциите на производителя.
 - Поставете gDNA в епруветката на ултразвуковия апарат бавно, за да избегнете образуването на мехурчета. Прекомерните мехурчета или въздушното пространство в епруветката за срязване могат да доведат до непълна фрагментация.
 - Разпределете бавно в епруветките на ултразвуковия апарат и избягвайте пръскането.
 - За да избегнете изместване на течността и загуба на пробата, не поставяйте крайника на пипетата в дъното на епруветката на ултразвуковия апарат, когато отстранявате фрагментирана DNA.
16. Не пипетирайте по-малко от 2 µl от въведената проба.

17. Не използвайте ваничка за дозиране на реагенти за стъпки, които изискват добавяне на по-малко от 10 µl материал към всяка ямка за проба.
18. Използвайте пипета P20, когато прехвърляте фрагментирана gDNA проба от епруветките на ултразвуковия апарат към плаката за приготвяне на библиотека (Library Prep, LP).
19. Не комбинирайте UMI и SUA1 адаптери.
20. Използвайте адаптери SUA1 с RNA проби.
21. Използвайте адаптери UMI с DNA проби.
22. Задайте различни индексни праймери за всяка библиотечна проба, за да идентифицирате уникално всяка библиотека, когато е обединена за секвениране в една поточна клетка.
23. Не комбинирайте индексни праймери CPxx и UPxx в една и съща библиотека.
24. Несъответствията между пробите и индексните праймери причиняват неправилно отчитане на резултатите поради загуба на положителна идентификация на пробата. Въведете идентификатори на пробите и задайте индекси в Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager, преди да започнете да пригответе библиотеката. Запишете идентификаторите на пробата, индексиранието и ориентацията на ямката на плаката за справка по време на приготвянето на библиотеката.
25. За библиотеки, получени от RNA проби, използвайте само UPxx индекси.
26. За библиотеки, получени от DNA проби, използвайте UPxx индекси или CPxx индекси.
27. Секвенирайте 8 RNA библиотеки и 8 DNA библиотеки на поточна клетка. Вижте [Брой библиотеки и подбор на индекси на страница 38](#).
28. Секвенирайте най-малко три библиотеки. Следвайте насоките в [Брой библиотеки и подбор на индекси на страница 38](#).
29. След стъпката на свързване в [Целево улавяне – първа част на страница 64](#) и [Целево улавяне – втора част на страница 68](#) продължете незабавно към стъпката на измиване, за да предотвратите изсъхване на гранулата.
30. По време на стъпките на измиване се уверете, че всичкият 80% етанол е отстранен от дъното на ямките. Остатъчният етанол може да повлияе на резултатите.
31. За оптимална ефективност на анализа следвайте посочения брой измивания, указан в [Инструкции за употреба на страница 41](#).
32. По време на процедурата за [Нормализиране на библиотеките на страница 74](#) старателно суспендирайте повторно гранулата от библиотеката, за да постигнете еднородна плътност на клъстерите на поточната клетка.

Процедурни бележки

- Работният процес на TSO Comprehensive (EU) може да се проведе по следния график.
 - Ден 1: Синтез на cDNA от RNA проби, DNA фрагментация на gDNA проби, приготвяне на библиотеките и начало на (първа) хибридизация за следващия ден.
 - Ден 2: Обогаляване, нормализиране на обогатените библиотеки и зареждане на библиотеките в Инструмент NextSeq 550Dx.
- Ако не е възможно да се изпълни работният процес на TSO Comprehensive (EU) съгласно този график, в целия протокол са посочени няколко безопасни точки на спиране. Освен ако в протокола не бъде посочена безопасна точка на спиране, продължете незабавно със следващата стъпка.
- Библиотеките, произхождащи от RNA и DNA проби могат да се приготвят едновременно в различни ямки.
 - Таблиците за приготвяне на основната смес включват превишаване на обема, за да се гарантира, че има достатъчно обем за броя на обработваните проби.
 - Използвайте вода от молекулярен тип, която не съдържа нуклеази.
 - След добавяне на реагент изплакнете крайника, като аспирирате и дозирате еднократно в подходящата ямка в плаката, освен ако не е посочено друго в процедурата.
 - Стайната температура се определя като температура между 15°C и 30°C.

Програми на термоциклера

- Програмирайте програмите на термоциклера на оборудване за преди амплификация и след амплификация, преди да стартирате протокола.
- Уверете се, че PCR плаките прилягат плътно в термоциклера.
- Използвайте плаки, препоръчани от производителя на термоциклера.

Запечатване и разпечатване на плаката

- Винаги запечатвайте плаките с ново залепващо уплътнение. Не използвайте повторно уплътнения.
- За да запечатате плаката, поставете здраво залепващия капак върху плаката с уплътнителен клин или валяк.
- Винаги запечатвайте 96-ямковата плака с ново залепващо уплътнение преди следващите стъпки в протокола.
 - Стъпки за разбъркване на плаката
 - Стъпки на центрофугиране
 - Стъпки на термоциклера

- Хибридизации
- Дългосрочно съхранение
- Уверете се, че ръбовете и ямките са запечатани, за да намалите риска от кръстосано замърсяване и изпаряване.
- Поставете плаката върху равна повърхност, преди бавно да отстраните уплътнението.
- Преди разпечатване, ако се наблюдава някаква течност или конденз върху уплътнението или страничните стени на ямките на плаките, центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
- Използвайте залепващи уплътнения, които са ефективни при -40°C до 110°C и са подходящи за закрити или полузакрити PCR плаки.

Оборудване

- Уверете се, че персоналът на лабораторията е запознат с инструкциите на производителя за експлоатацията и поддръжката на цялото оборудване, преди да започнете анализа.

Тип плака и прехвърляния на плака

- Необходим е подходящ тип плака за оптимално изпълнение на анализа и съхранение.
- Когато прехвърляте обеми между плаките, прехвърлете посочения обем от всяка ямка на плаката в съответната ямка на целевата плака.
- Многоканални пипети могат да се използват при прехвърляне на проби между ленти или плаки на епруветките.
- Използвайте следните указания при разбъркване на плаки.
 - Използвайте уред за разбъркване на плака, за да разбъркате плаката. Не вортексирайте плаките.
 - Разбърквайте PCR плаките при 1200 об/мин.
 - Разбърквайте MIDI плаките при 1800 об/мин.
 - Следвайте инструкциите на производителя, за да се гарантира, че уредът за разбъркване на плаката държи плаката здраво.

Центрофугиране

- Когато инструкциите в протокола показват центрофугиране за кратко, центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
- Ако се наблюдава течност върху уплътнението или по стените на ямката, центрофугирайте плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.

Работа с реагенти

- Затворете плътно всички епруветки с реагент веднага след употреба, за да ограничите изпарението и да предотвратите замърсяване.
- Върнете реагентите до определената температура на съхранение, когато вече не са необходими за процедура.
- Следвайте подготовката на реагента, която предхожда всяка процедура в раздела [Инструкции за употреба на страница 41](#).
- Уверете се, че сте подготвили необходимия обем основна смес, смес за елуиране и 80% етанол за броя на пробите, които обработвате.
- Обемите, предоставени в таблиците за основна смес и разтвори, съдържат остатък. Изчисленията за остатъчния обем са както следва.
 - [Таблица 14](#)
 - Обем на FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{брой проби} + \text{контроли}) \times (1,25)$.
 - Обем на RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{брой проби} + \text{контроли}) \times (1,25)$.
 - [Таблица 21](#)
 - Обем на ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,20)$.
 - Обем на ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,20)$.
 - [Таблица 29](#)
 - Обем на EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,364)$.
 - Обем на HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,364)$.
 - [Таблица 30](#)
 - Обем на EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,364)$.
 - Обем на HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,364)$.
 - [Таблица 36](#)
 - Обем на LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (2,0)$.
 - Обем на LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (2,0)$.
 - [Таблица 37](#)
 - Обем на EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,25)$.
 - Обем на HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,25)$.

Комплекти адаптери

- Анализът TSO Comprehensive (EU) включва UMI адаптери и SUA1 адаптери.
- SUA1 адаптерите са предназначени за използване с RNA проби, а не с DNA.

- UMI адаптерите са предназначени за използване с DNA проби, а не с RNA.

Боравене с топчета

- Три типа топчета са включени в анализа TSO Comprehensive (EU) (SPB, SMB и LNB1). Уверете се, че по време на процедурата се използва правилният тип топчета.
- Извършете правилния брой измивания за всеки тип топчета.
- Уверете се, че топчетата са на стайна температура преди употреба.
- Смесете топчетата за 1 минута преди употреба, за да осигурите хомогенност.
- Използвайте следните указания, когато смесвате топчетата с пипета.
 - Използвайте подходяща пипета и размер на накрайника за обема, който смесвате.
 - Настройте обема на приблизително 50 – 75% от обема на пробата.
 - Пипетирайте бавно, без да отпускате буталото.
 - Избягвайте пръскането и въвеждането на мехурчета.
 - Поставете върха на пипетата над гранулата и дозирайте директно в нея, за да освободите топчетата от ямката или епруветката.
 - Уверете се, че гранулата е напълно покрита в разтвор. Разтворът трябва да изглежда тъмнокафяв и да има хомогенна консистенция.
 - Оценете дали има гранула. Внимателно аспирирайте общия разтвор на топчета в ямката във върха и погледнете в дъното на ямките.
- Ако топчетата се аспирират във върховете на пипетата по време на етапите на магнитно разделяне, разпределете топчетата обратно в ямката на плаката на магнитната стойка. Изчакайте, докато течността се избистри (приблизително 2 минути), преди да преминете към следващата стъпка от процедурата.
- При измиване на топчетата:
 - Използвайте препоръчаната магнитна стойка за плаката.
 - Разпределете течността директно върху гранулата, така че топчетата отстрани на ямките да се намокрят.
 - Дръжте плаката на магнитната стойка, докато процедурата не посочи да я отстраните.
 - Не разклащайте плаката, докато е на магнитната стойка.
 - Не местете гранулата, докато е на магнитната стойка.
- Когато измивате топчетата или премахвате супернатанта, наклонете върховете на пипетата в долната част на ямките, за да избегнете създаване на вакуум и изтегляне на разтвор във филтрите на върха на пипетата.

Формуляр за лабораторно проследяване

- *Лабораторен формуляр за проследяване TruSight Oncology Comprehensive (EU) (документ № 200009022)* предоставя контролен списък на стъпките от протокола.

Брой библиотеки и подбор на индекси

Преди настройката на изпълняване планирайте броя на библиотеките с проби и индексите на пробите за изпълняване на секвениране. Следните указания за броя на пробите включват положителни контроли, но изключват отрицателни контроли/контроли без шаблон (NTC). NTC трябва да се добави към планираното изпълняване като допълнителна проба.

За TSO Comprehensive (EU) следвайте указанията в [Таблица 6](#) и [Таблица 7](#) за определяне на броя на библиотеките за секвениране в една поточна клетка.

Таблица 6 RNA или DNA библиотеки за TSO Comprehensive (EU)

Тип библиотека	Минимум*	Максимум
RNA	3	16
DNA	3	8

За оптимално използване на реагенти при секвениране TSO Comprehensive (EU) на Инструмент NextSeq 550Dx, секвенирайте 8 RNA библиотеки + 8 DNA библиотеки на поточна клетка.

Таблица 7 Комбинирани RNA и DNA библиотеки за TSO Comprehensive (EU)

Брой DNA библиотеки	Брой RNA библиотеки
8	8

По време на приготвянето на библиотеката добавете праймер на индекса към всяка библиотека с проби. *Използвайте различна смес за праймер на индекса за всяка библиотека с проби.* Праймерите на индекса идентифицират уникално всяка проба, така че библиотеките да могат да бъдат обединени заедно за секвениране в една поточна клетка. (Съвместимите комбинации от индекси се показват на екрана Create Run (Създаване на изпълняване) по време на настройката на стартиране в Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager.)

Уверете се, че праймерите на индекси, които използвате с пробите, съответстват на индексите, които сте избрали в Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager.

Несъответствията причиняват неправилно отчитане на резултатите поради загуба на положителна идентификация на пробата.

Има два типа индекси в анализа TSO Comprehensive (EU).

- **UPxx индекси** – Използвайте UPxx индекси за библиотеки, получени от RNA или DNA проби.
- **CPxx индекси** – Използвайте CPxx индекси за библиотеки, получени от DNA проби. Не използвайте индекси CPxx за библиотеки, получени от RNA или ако секвенирате общо три DNA библиотеки.

При секвениране само на три библиотеки е необходимо следното.

- Библиотеките трябва да са изцяло DNA или изцяло RNA.
- Не използвайте набори от индекси CPxx.
- Един от следните набори от UPxx индекси е необходим, за да осигури достатъчно разнообразие.
 - UP01, UP02 и UP03
 - UP04, UP05 и UP06
 - UP07, UP08 и UP09
 - UP10, UP11 и UP12

Например на първата библиотека е назначен UP01, на втората библиотека UP02, а на третата библиотека UP03.

TruSight Oncology Controls

TSO Comprehensive (EU) изисква използването на TruSight Oncology Controls, които се състоят от TruSight Oncology DNA контрола и TruSight Oncology RNA контрола като положителни контроли. Включете TruSight Oncology DNA контрола за всяко изпълняване на секвениране на DNA и TruSight Oncology RNA контрола за всяко изпълняване на секвениране на RNA в рамките на дадено събитие за приготвяне на библиотека (включете и контроли за комбинирано изпълняване на DNA и RNA). Подготвя се уникална положителна контрола за всяко планирано изпълняване на секвениране.

Включете една NTC във всяка RNA и всяко събитие за приготвяне на DNA библиотека. NTC се секвенира многократно в рамките на едно събитие за приготвяне на библиотека. Следвайте тези указания за TruSight Oncology Controls:

- Подгответе библиотеки от положителните контроли и контролите без шаблон по същия начин като пробите.
- Използвайте TEB за DNA NTC.
- Използвайте вода без DNase/RNase за RNA NTC.
- Положителните контроли са включени в максималното изискване за библиотека.
- NTC не са включени в минималното изискване за библиотека.
- Използвайте UP индекси за NTC, когато секвенирате 3 библиотеки.
- Тъй като NTC се секвенира многократно, индексите, избрани за тази контрола, не могат да бъдат повторени в събитието за приготвяне на библиотеката.

Таблиците по-долу показват примерни оформления на плаки за приготвяне на библиотеката. Всяка номерирана колона представлява едно изпълняване на секвениране. Когато се секвенират DNA и RNA библиотеки заедно, всеки съответен набор от колони представлява единично изпълняване на секвениране (например колона 1 и колона 7). NTC се секвенира за всяка колона или набор от колони.

Таблица 8 Събитие за приготвяне на библиотеката от единично изпълняване, включващо шест проби от пациенти

	1	2	3	4	5	6	7
A	Пол. DNA контрола	празно	празно	празно	празно	празно	Пол. RNA контрола
B	DNA 1	празно	празно	празно	празно	празно	RNA 1
C	DNA 2	празно	празно	празно	празно	празно	RNA 2
D	DNA 3	празно	празно	празно	празно	празно	RNA 3
E	DNA 4	празно	празно	празно	празно	празно	RNA 4
F	DNA 5	празно	празно	празно	празно	празно	RNA 5
G	DNA 6	празно	празно	празно	празно	празно	RNA 6
H	DNA NTC	празно	празно	празно	празно	празно	RNA NTC

Таблица 9 Събитие за приготвяне на библиотеката от три изпълнявания, включващи 20 проби от пациенти

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

Инструкции за употреба

Общ преглед на работния процес на TSO Comprehensive (EU) е показан на [Фигура 1](#) и [Фигура 2](#).

Работен процес за приготвяне на библиотека

[Фигура 1](#) илюстрира работния процес за приготвяне на библиотека за TSO Comprehensive (EU).

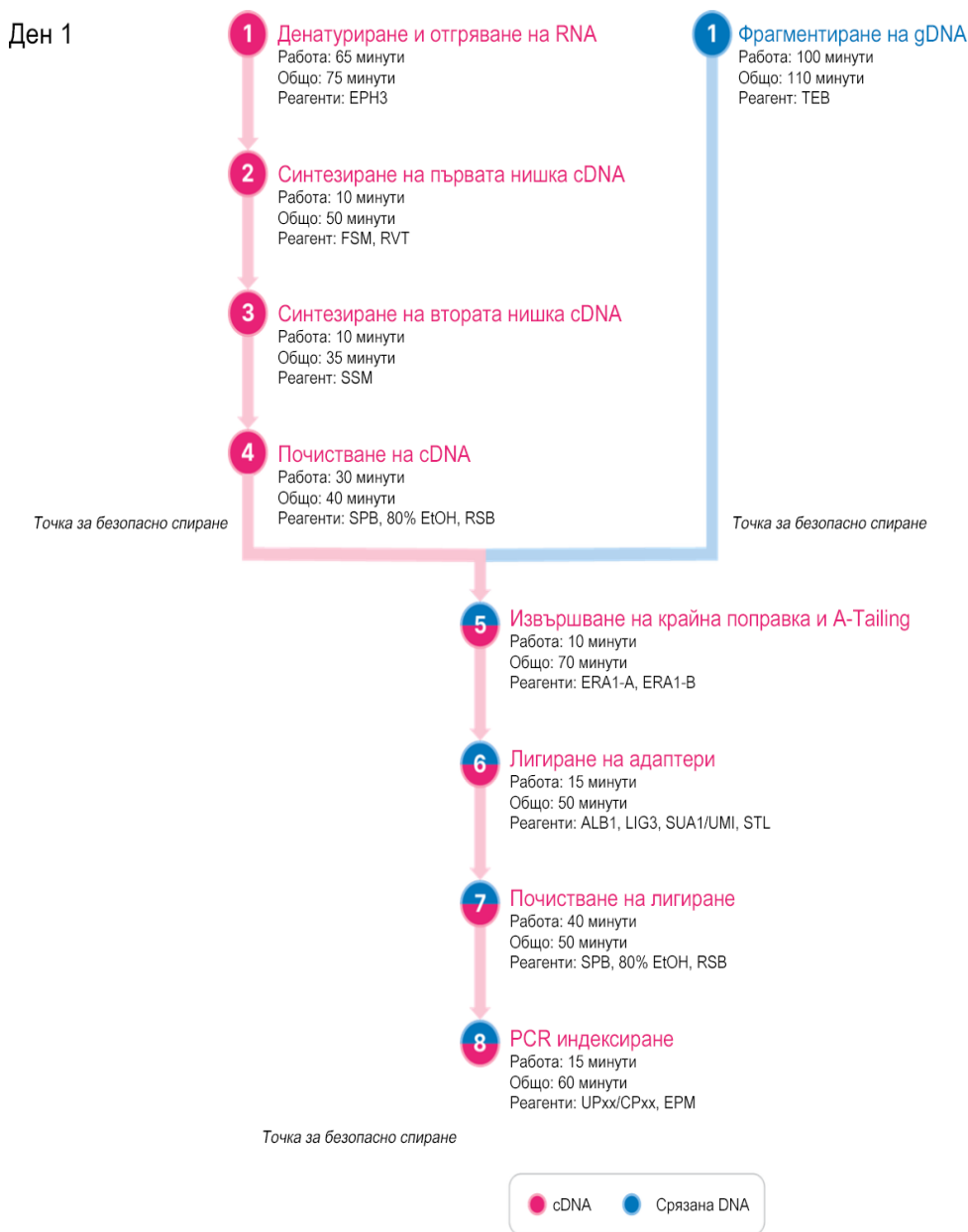
Библиотеките за RNA и DNA проби могат да се приготвят едновременно в различни ямки.

Положителните контроли и контролите без шаблон се обработват по същия начин като пробите. Между стъпките са маркирани точки за безопасно спиране.

Преди да започнете протокола, въведете информация за изпълняване и за проба в бланка за проби v2, която да се използва с Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager.

Вижте Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661).

Фигура 1 Работен процес TSO Comprehensive (EU) (Част 1)



* Работата и общото време са приблизителни.

Работен поток за обогатяване

Фигура 2 илюстрира работния поток за обогатяване за TSO Comprehensive (EU). Между стъпките са маркирани точки за безопасно спиране.

Фигура 2 Работен процес TSO Comprehensive (EU) (Част 2)



Програмни термоциклери

Преди да започнете анализа, запазете следните програми на термоциклери преди и след амплификация.

Таблица 10 Програми на термоциклери преди амплификация

Процедурна стъпка	Име на програмата	Температура на капака	Обем на реакция	Параметри на термоциклер
Денатуриране и отгряване на RNA	LQ-RNA	100°C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65°C в продължение на 5 минути • 4°C в продължение на 1 минута • 4°C задържане
Синтезиране на първата верига cDNA	1stSS	100°C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25°C в продължение на 10 минути • 42°C в продължение на 15 минути • 70°C в продължение на 15 минути • 4°C в продължение на 1 минута • 4°C задържане
Синтезиране на втората верига cDNA	2ndSS	30°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16°C в продължение на 25 минути • 4°C в продължение на 1 минута • 4°C задържане

ЗАБЕЛЕЖКА Ако температурата на капака за 2ndSS не може да бъде зададена на 30°C, изключете опцията за нагряване на предварително загрят капак.

Таблица 11 Програми на термоциклери след амплификация

Процедурна стъпка	Име на програмата	Температура на капака	Обем на реакция	Параметри на термоциклер
PCR индексирание	I-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 30 секунди • 15 цикъла от: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 10 секунди • 60°C в продължение на 30 секунди • 72°C в продължение на 30 секунди • 72°C в продължение на 5 минути • 10°C задържане
Извършване на първа хибридизация	HYB1	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C в продължение на 10 минути • 85°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 75°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 65°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 57°C задържане за 8 до 24 часа
Извършване на втора хибридизация	HYB2	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C в продължение на 10 минути • 85°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 75°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 65°C в продължение на 2 мин 30 секунди • 57°C задържане за 1,5 до 4 часа

Процедурна стъпка	Име на програмата	Температура на капака	Обем на реакция	Параметри на термоциклер
Усилване на обогатена библиотека	EL-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 30 сек • 18 цикъла от: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 10 сек • 60°C в продължение на 30 сек • 72°C в продължение на 30 сек • 72°C в продължение на 5 мин • 10°C задържане

Подготовка за стъпките на протокола

1. Старателно отстранете замърсяването от работните зони с почистващ препарат, инхибиращ RNase/DNase.



ВНИМАНИЕ

Всички процедури в работния процес изискват среда без RNase/DNase.

2. Задайте програми за термоциклери преди амплификация. Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).
3. Следвайте инструкциите на производителя, за да настроите ултразвуковия апарат.
4. Ако обработвате само DNA проби, преминете директно към [Фрагментиране на gDNA на страница 52](#).
5. Извадете RNA контролите от съхранение.
6. Извадете епруветките с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (част № 20031127)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
EPH3	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура	Денатуриране и отгряване на RNA
FSM	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура	Синтезиране на първата верига cDNA
RVT	-25°C до -15°C	Задръжете върху лед	Синтезиране на първата верига cDNA
SSM	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура	Синтезиране на втората верига cDNA

Таблица 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (част № 20031119)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
SPB (светлозелен етикет)	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура в продължение на 30 минути.	Почистване на cDNA
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Почистване на cDNA

Денатуриране и отгряване на RNA

Този процес денатурира пречистена RNA и праймира с произволни хексамери в подготовка за синтез на cDNA.

Подготовка

- Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - EPH3 – Оставете настрана.
 - FSM – Вortexируйте, за да се смесят. Центрофугируйте за кратко, после пипетируйте, за да смесите.
Реагентът може да съдържа бели частици, свързани с продукта. Не се изисква действие от страна на потребителя. Няма въздействие върху производителността на продукта.
 - RVT – Центрофугируйте за кратко, после пипетируйте, за да се смеси. Задръжте върху лед.

ЗАБЕЛЕЖКА RVT е вискозен разтвор. Сведете до минимум образуването на мехурчета по време на пипетиране.

- В микроцентрифужна епруветка комбинирайте следните обеми, за да пригответе основна смес FSM + RVT.

Таблица 14 Главна смес FSM + RVT

Компонент на основна смес	4 библиотеки (µl)	8 библиотеки (µl)	16 библиотеки (µl)	24 библиотеки (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте [Работа с реагенти на страница 35](#) за изчисления.

- Пипетируйте десет пъти, за да се смеси.
- Поставете основната смес FSM + RVT върху лед до [Синтезиране на първата верига cDNA на страница 48](#).

Процедура

1. Размразете извлечените RNA проби и RNA контролите върху лед.
Обработете RNA контролите като проби за останалата част от протокола.
2. Съхранявайте RNA върху лед, когато не се използва. Вижте [Изисквания за пробите на страница 27](#) за количествено определяне на пробите.
3. Пипетирайте всяка RNA проба 10 пъти, за да се смеси.
4. Използвайте вода без RNase/DNase, за да пригответе 40 ng от всяка RNA проба в краен обем от 8,5 µl (4,7 ng/µl).
За RNA контроли използвайте концентрацията, предоставена на етикета на епруветката.
5. Етикетирайте нова 96-ямкова PCR плака като CF (сDNA фрагменти).
6. Добавете 8,5 µl от всяка RNA проба към уникална ямка на CF PCR плаката.
7. Уверете се, че оформлението и индексите на пробната плака за всяка проба съвпадат с планираното изпълняване в Модул за анализ TSO Comprehensive (EU) по време на настройката на изпълняването.
8. Вортексирайте EPH3, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
9. Добавете 8,5 µl EPH3 към всяка ямка за проба.
10. Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.



ВНИМАНИЕ

Уверете се, че сте запечатали добре ръбовете и ямките, за да предотвратите изпаряване.

11. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
12. Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
13. Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата за LQ-RNA.
Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).
14. Когато пробите достигнат 4°C, задръжте за една минута и след това преминете незабавно към следващата стъпка.

Синтезиране на първата верига сDNA

Този процес обратно транскрибира RNA фрагментите, праймирани с произволни хексамери в първата верига сDNA, използвайки обратна транскриптаза.

Процедура

1. Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
2. Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси основната смес FSM + RVT. Уверете се, че миксът FSM + RVT е напълно хомогенен.
3. Добавете 8 µl основна смес FSM + RVT към всяка ямка за проба.
4. Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.

5. Изхвърлете останалата основна смес FSM + RVT.
6. Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
7. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
8. Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
9. Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата 1stSS.
Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).
10. Когато пробите достигнат 4°C, преминете незабавно към следващата стъпка.
Пробите от първата верига могат да се държат при 4°C за до 5 минути.

Синтезиране на втората верига cDNA

Този процес премахва RNA шаблона и синтезира cDNA с двойна верига.

Подготовка

1. Подгответе посочения по-долу реагент.
 - SSM – Обърнете 10 пъти, за да се смеси. Центрофугирайте за кратко.

Процедура

1. Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
2. Добавете 25 µl SSM към всяка ямка за проба.
3. Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
4. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
5. Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
6. Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата 2ndSS.
Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).
7. Когато пробите достигнат 4°C, задръжте за една минута и след това преминете незабавно към следващата стъпка.

Почистване на cDNA

Този процес използва SPB, за да почисти частите от лигираните от адаптери cDNA от нежелани продукти. Топчетата се измиват два пъти в пресен 80% етанол. cDNA се елуира с RSB.

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.

- SPB – Уверете се, че топчетата са на стайна температура за 30 минути.
- RSB – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.

2. Пригответе пресен 80% EtOH в конична епруветка от 15 ml или 50 ml.

Таблица 15 Приготвяне на пресен 80% EtOH

Реагент	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки
100% етилов алкохол, чист	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Вода без RNase/DNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Вортексирайте пресен 80% EtOH за смесване.
4. Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака BIND1 (сDNA свързване).
5. Покрийте и оставете настрана.
6. Поставете магнита.

Процедура

Свързване

1. Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
2. Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
3. Незабавно добавете 90 µl SPB към ямката на всяка проба от BIND1 MIDI платка.
Ако използвате ваничка за дозиране на SPB, включете коефициент на излишък от 1,05, когато алиquotирате достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SPB бъде добавен към всяка ямка за проба.
4. Прехвърлете целия обем (50 µl) на всяка проба от CF PCR плаката в съответната ямка на BIND1 MIDI плаката.
5. Изхвърлете празната CF PCR плака.
6. Добавете залепващ уплътнител към BIND1 MIDI плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
7. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
8. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
9. Поставете BIND1 MIDI плаката на магнитна стойка за 5 минути.
10. Използвайте пипета P200, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Оставете на магнитната стойка и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка.
 - b. Изчакайте 30 секунди.
 - c. Отстранете и изхвърлете всички супернатант от всяка ямка.
2. Измийте топчетата *втори* път.
3. Премахнете остатъчния EtOH от всяка ямка.
Използвайте пипета P20 с фини накрайници.
4. Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

1. Отстранете плаката BIND1 MIDI от магнитната стойка.
2. Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
3. Добавете 22 µl RSB към всяка ямка за проба.
4. Добавете залепващ уплътнител към BIND1 MIDI плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
5. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
6. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
7. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
8. Етиктирайте нова 96-ямкова MIDI плака PCF (Пречистени cDNA фрагменти).
Ако спирате на [БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ на страница 51](#), използвайте PCR плака.
9. Прехвърлете 20 µl елуат от всяка ямка за проба на BIND1 MIDI плаката в съответната ямка на PCF плаката.
10. Отстранете празната BIND1 MIDI плака.
11. Добавете 30 µl RSB към всяка ямка за проба на PCF плаката.
12. Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
13. Нанесете залепващо уплътнение върху PCF плаката и я задръжте върху лед.
14. Върнете EPH3, FSM, RVT, и SSM за съхранение.
15. Ако обработвате проби, получени само от RNA (cDNA), и не спрете на точката за безопасно спиране, продължете към [Извършване на крайна поправка и A-Tailing на страница 55](#).

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугирайте PCF PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 7 дни.

Подготовка за стъпките на протокола

1. Извадете DNA контролите от съхранение.
2. Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (част № 20031119)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
TEB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Фрагментиране на gDNA

Фрагментиране на gDNA

Този процес фрагментира gDNA (геномна DNA) и генерира dsDNA (двуверижна DNA) фрагменти с 3' или 5' надвеси.

Подготовка

1. Не забравяйте да следвате препоръките в [Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27](#), за да определите количествено пробите.
2. Подгответе посочения по-долу реагент.
 - TEB – Обърнете или вортексирайте, за да се смеси.

Процедура

Подгответе плаката

1. Изберете една от следните три опции, за да подгответе плаката.
 - **Опция № 1:** Обработвайте gDNA проби едновременно със cDNA (комплементарна DNA) проби в PCF MIDI плаката.
 - a. Етикетирайте PCF MIDI плаката като LP (Library Preparation, Приготвяне на библиотека).
 - b. Поставете върху лед и оставете настрана, за да се използва в [Прехвърляне на фрагментирана DNA на страница 54](#).
 - **Опция № 2:** Обработвайте gDNA проби едновременно със cDNA проби и PCF PCR плаката е замразена.
 - a. Размразете PCF PCR плаката до стайна температура.
 - b. Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
 - c. Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
 - d. Етикетирайте 96-ямкова MIDI плака като LP (Library Preparation, Приготвяне на библиотека).
 - e. Прехвърлете всички 50 µl от всяка проба от PCF PCR плаката в съответната ямка на LP MIDI плаката.

- f. Изхвърлете PCF PCR плаката.
- g. Нанесете адхезивно уплътнение на плаката и поставете върху лед, до [Прехвърляне на фрагментирана DNA на страница 54](#).
- Опция № 3: Обработвайте само gDNA проби.
 - a. Етикетирайте 96-ямкова MIDI плака като LP (Library Preparation, Приготвяне на библиотека).
 - b. Ако спирате на [БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ на страница 54](#), използвайте PCR плака.
 - c. Покрийте и оставете настрана за употреба в [Прехвърляне на фрагментирана DNA на страница 54](#).

Разреждане на gDNA

- Размразете пробите от gDNA и DNA контролите при стайна температура.
- Пипетирайте всяка gDNA проба 10 пъти, за да се смеси.
- Центрофугирайте епруветката за кратко, за да съберете капчиците.
- Обърнете или вортексирайте ТЕВ, за да се смеси.
- Използвайте ТЕВ, за да пригответе всяка gDNA проба в краен обем от 52 µl. Вижте следващата таблица за входните количества и минималните концентрации въз основа на типа на пробата. Анализът изисква минимална концентрация на екстракция, за да се даде възможност за най-малко 40 µl ТЕВ от обема от 52 µl. За DNA контроли използвайте концентрацията, предоставена на етикета на епруветката. За да предотвратите загуба на проби, не пипетирайте по-малко от 2 µl от пробата в това разреждане.

Тип проба	Входящо количество (ng)	Минимална концентрация (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Контрола	40	Вижте етикета на епруветката

Фрагмент

- Добавете 52 µl от всяка gDNA проба в отделна ямка на епруветката за ултразвук.



ВНИМАНИЕ

Сложете gDNA в епруветката бавно, като се уверите, че няма въздушни междини на дъното на епруветката. За повече информация вижте [Анализ на страница 30](#) и инструкциите на производителя.

- Запишете ориентацията на лентата.
- Разделете gDNA на фрагменти с ултразвуков апарат.

Прехвърляне на фрагментирана DNA

1. Уверете се, че оформлението и индексите на пробната плака за всяка проба съответстват на изпълняването, избрано от Вас за анализ с Модул за анализ TSO Comprehensive (EU).
2. Следвайте инструкциите на производителя на ултразвуковия апарат, за да възстановите пробата. За някои типове ултразвукови епруветки може да е необходимо центрофугиране, за да се консолидира пробата в епруветката.
3. За всяка фрагментирана gDNA проба използвайте р20 пипета с фини връхчета, за да извършите три прехвърляния на 16,7 µl в празна ямка на LP MIDI плака.
4. Добавете залепващо уплътнение за плака към LP MIDI плаката.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, нанесете залепващо уплътнение на LP PCR плаката и центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута. Съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 7 дни.

Подготовка за стъпките на протокола

Уверете се, че са зададени програми за термоциклери след амплификация. Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).

1. Пригответе кофа с лед.
2. Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (част № 20031118)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
ERA1-A	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	Извършване на крайна поправка и A-Tailing
ERA1-B	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Извършване на крайна поправка и A-Tailing
ALB1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
LIG3	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	Лигиране на адаптери
SUA1 (синя капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
UMI (бяла капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
STL	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
EPM	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	PCR индексирание

Таблица 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (част № 20031119)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
SPB (светлозелен етикет)	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура в продължение на 30 минути.	Почистване на лигиране
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Почистване на лигиране

Таблица 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (част № 20031120)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
UPxx	-25°C до -15°C	Размразете съответните епруветки с индексни праймери до стайна температура.	PCR индексирание

Таблица 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (част № 20031126)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
CPxx	-25°C до -15°C	Размразете съответните епруветки с индексни праймери до стайна температура.	PCR индексирание

Извършване на крайна поправка и A-Tailing

Този процес поправя надвесите в резултат на фрагментиране в краища с надвиснала A-tail, като се използва основна смес за крайна поправка на A-Tailing (ERA1).

Екзонуклеазната активност от 3' до 5' на тази смес премахва 3' надвесите и полимеразната активност от 5' до 3' запълва 5' надвесите. Краищата 3' са с A-tail по време на тази реакция, за да се предотврати свързването им един с друг по време на реакцията на лигиране на адаптера.

Подготовка

- Предварително загрейте 2 инкубатора за микропроби с MIDI термоблокови вложки, както следва.
 - Загрейте инкубатор за микропроби до 30°C.
 - Загрейте инкубатор за микропроби до 72°C.
- Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ERA1-A – центрофугирайте за кратко, после пипетирайте, за да се смеси. Задръжте върху лед.
 - ERA1-B – вортексирайте, за да се смеси, и после центрофугирайте за кратко. Проверете за утайки. Ако има, загрейте епруветката до 37°C и след това смесете с пипета, докато утайките се разтворят.
- Пригответе основната смес ERA1 в епруветка за микроцентрофуга.

Таблица 21 Основна смес ERA1¹

Компонент на основна смес	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
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

¹ Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте [Работа с реагенти на страница 35](#) за изчисления.

- Пипетирайте бавно 10 пъти, за да се постигне хомогенност, центрофугирайте за кратко и след това поставете основната смес ERA1 върху лед.
- Изберете подходящата опция от следните две опции, за да подготвите плаката.
 - Опция № 1:** Ако пробите са в MIDI плака:
 - Етикетирайте отново MIDI плаката като LP2 (Library Preparation 2, Приготвяне на библиотека 2).

Ако някои проби са в отделни MIDI плаки, преместете всички проби в отделни ямки на една и съща MIDI плака в съответствие с оформлението на плаката.
 - Опция № 2:** Ако плаката е замразена:
 - Размразете PCF PCR плаката или LP PCR плаката до стайна температура.
 - Центрофугирайте плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
 - Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
 - Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака като LP2 (Library Preparation 2, Приготвяне на библиотека 2).
 - Прехвърлете всички 50 µl от всяка проба от PCF PCR плаката или LP PCR плаката в съответната ямка на LP2 MIDI плаката.
 - Изхвърлете PCF PCR или LP PCR плаката.

Процедура

- Добавете 10 µl основна смес ERA1 към всяка ямка за проба на LP2 MIDI плаката.
- Изхвърлете останалата част от основна смес ERA1.
- Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- Инкубирайте в предварително загрят инкубатор за микропроби при 30°C за 30 минути.
- Незабавно прехвърлете във втори, предварително загрят инкубатор за микропроби и инкубирайте при 72°C за 20 минути.
- Поставете LP2 MIDI плаката върху лед за 5 минути.

Лигиране на адаптери

Този процес лигира адаптерите до края на cDNA и/или gDNA фрагментите.

Анализът TSO Comprehensive (EU) включва адаптери SUA1 и адаптери UMI.

- Използвайте адаптери SUA1 с RNA проби.
- Използвайте адаптери UMI с DNA проби.

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ALB1 – Вортексирайте за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугируйте за кратко.
 - LIG3 – Центрофугируйте за кратко и след това пипетирайте, за да се смесят. Задръжте върху лед.
 - SUA1 – Вортексирайте за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугируйте за кратко.
 - UMI – Вортексирайте за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугируйте за кратко.
 - STL – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.

Процедура

1. Отстранете LP2 MIDI плаката от леда.
2. Добавете 60 µl ALB1 към всяка ямка за проба на LP2 MIDI плаката. ALB1 е вискозен разтвор; минимизирайте образуването на мехурчета по време на пипетиране.
3. Добавете 5 µl LIG3 към всяка ямка за проба.
4. Добавете адаптери.
Не комбинирайте различни типове адаптери.
 - **RNA ямки за проба** – 10 µl SUA1 (синя капачка) към всяка проба, получена от RNA.
 - **DNA ямки за проба** – 10 µl UMI (бяла капачка) към всяка проба, получена от DNA.
5. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
6. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
7. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 30 минути.
8. Вортексирайте STL, за да се смеси, и после центрофугируйте за кратко.
9. Добавете 5 µl STL към всяка ямка за проба на LP2 MIDI плаката.
10. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
11. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.

Почистване на лигиране

Този процес използва SPB, за да почисти частите от лигираните с адаптери cDNA или gDNA фрагменти и за да премахне нежеланите продукти. Топчетата се измиват два пъти в пресен 80% етанол. Лигираните с адаптери проби се елуират с RSB.

Подготовка

- Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - SPB – Уверете се, че топчетата са на стайна температура за 30 минути.
 - RSB – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- Пригответе пресен 80% EtOH в конична епруветка от 15 ml или 50 ml.

Таблица 22 Пригответе пресен 80% етанол

Реагент	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
100% етилов алкохол, ЧИСТ	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Вода без RNase/DNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Вортексирайте пресен 80% EtOH за смесване.
- Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
- Незабавно добавете 112 µl SPB към ямката на всяка проба от LP2 MIDI плаката.
Ако използвате ваничка за дозиране на SPB, включете коефициент на излишък от 1,05, когато аликвотирате достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SPB бъде добавен към всяка ямка за проба.
- Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
- Поставете LP2 MIDI плаката на магнитната стойка за поне 10 минути.
- Използвайте пипета P200, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Оставете на магнитната стойка и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка за проба.
 - b. Изчакайте 30 секунди.
 - c. Отстранете и изхвърлете всички супернатант от всяка ямка, без да се нарушава гранулата.
2. Измийте топчетата *втори* път.
3. Премахнете остатъчния EtOH от всяка ямка.
Използвайте пипета P20 с фини крайници.
4. Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

1. Отстранете LP2 MIDI плаката от магнитната стойка.
2. Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
3. Добавете 27,5 µl RSB към всяка ямка за проба.
4. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
5. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
6. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
7. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
8. Поставете етикет на нова 96-ямкова PCR плака LS (Проби на библиотеката).
9. Прехвърлете 25 µl от всеки елуат от LP2 MIDI плака в съответната ямка на LS PCR плака.
10. Изхвърлете празната LP2 MIDI плака.

PCR индексирание

В тази стъпка фрагментите на библиотеката се амплифицират с помощта на праймери, които добавят секвениране на индекса за мултиплексиране на проби. Полученият продукт съдържа пълната библиотека от cDNA и/или фрагменти от DNA, фланкирани от адаптери, необходими за генериране на клъстери.

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - EPM – Задръжете върху лед.
 - UPxx – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко. UPxx е индексният праймер, избран на екрана Create Run (Създаване на изпълняване) в софтуера Local Run Manager по време на настройката на изпълняване.

- CPxx – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко. CPxx е индексният праймер, избран на екрана Create Run (Създаване на изпълняване) в софтуера Local Run Manager по време на настройката на изпълняване.
2. Уверете се, че индексите за всяка проба съвпадат с планираното изпълняване в Модул за анализ TSO Comprehensive (EU) по време на настройката на изпълняване. Не забравяйте да следвате инструкциите относно избора на индекс в [Брой библиотеки и подбор на индекси на страница 38](#).

**ВНИМАНИЕ**

Несъответствията между пробите и индексните праймери причиняват неправилно отчитане на резултатите поради загуба на положителна идентификация на пробата.

Процедура

1. Добавете 5 µl от подходящия индексен праймер (UPxx или CPxx) към съответната ямка за проба в LS PCR плаката в съответствие с избраните индекси.

**ВНИМАНИЕ**

Работете с една и отваряйте само една индексна праймерна епруветка в даден момент. Затворете отново всяка индексна епруветка с нова капачка веднага след употреба. Не комбинирайте индексни праймери заедно.

2. Вортексирайте EPM за 5 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
3. Добавете 20 µl EPM към всяка ямка за проба.
4. Добавете залепващо уплътнение към LS PCR плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
5. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
6. Върнете предамплификационните реагенти за съхранение.

**ВНИМАНИЕ**

Изпълнете всички следващи стъпки в зона след амплификация, за да предотвратите пренасяне на продукта от амплификация.

7. Центрофугирайте LS PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
8. Поставете върху предварително програмирания термоциклер след амплификация и стартирайте програмата I-PCR. Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).

ЗАБЕЛЕЖКА Ако продължавате с [Настройване на първата хибридизация на страница 61](#), следвайте инструкциите за размразяване на реагентите в Стъпките за подготовка на протокола.

9. След като програмата I-PCR завърши, центрофугирайте LS PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
10. Поставете отново етикета ALS (амплифицирани библиотечни проби) на плаката.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, съхранявайте ALS PCR плаката при температура от -25°C до -15°C за период до 30 дни.

Подготовка за стъпките на протокола

1. Уверете се, че са зададени програми за термоциклери след амплификация. Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).
2. Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (част № 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
TCSB1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Настройване на първата хибридизация

Таблица 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (част № 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
TCA1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на първата хибридизация

Таблица 25 TruSight Oncology Comp Content Set Box (част № 20031122)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
OPR1 (червена капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на първата хибридизация
OPD2 (бяла капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на първата хибридизация

Настройване на първата хибридизация

По време на този процес пул от олигонуклеотиди хибридизира със cDNA библиотеки и пул от олигонуклеотиди хибридизира с gDNA библиотеки, приготвени в [PCR индексирание на страница 59](#). Обогатяването на целевите региони изисква две стъпки на хибридизация. При първата хибридизация олигонуклеотидите хибридизират със cDNA библиотеки и/или gDNA библиотеки за следващия ден (8 часа до 24 часа).

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - TCB1 – Загрейте епруветката при 37°C в продължение на 5 минути. Вортексирайте за 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - TCA1 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - OPR1 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - OPD2 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
2. Ако ALS PCR плаката е била съхранявана, размразете до стайна температура и центрофугирайте при 280 x g в продължение на 1 минута. След това пипетирайте за смесване.
3. Поставете етикет HYB1 (Хибридизация 1) на нова 96-ямкова PCR плака.

Процедура

1. Прехвърлете 20 µl от всяка cDNA и/или gDNA библиотека от ALS PCR плаката в съответната ямка в HYB1 PCR плаката.
2. Нанесете залепващо уплътнение върху ALS PCR плаката и оставете настрана. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
3. Проверете TCB1 за утайки. Ако има, загрейте епруветката отново и разбъркайте епруветката, докато кристалите се разтворят.
4. Добавете 15 µl TCB1 към всяка библиотечна ямка в HYB1 PCR плаката.
5. Добавете 10 µl TCA1 към всяка библиотечна ямка в HYB1 PCR плаката.
6. Добавете сонди.
Не комбинирайте различни типове сонди. Добавете само по един комплект сонда на ямка.
 - Ямки с RNA библиотеки – 5 µl OPR1 (червена капачка) към всяка библиотека, получена от RNA.
 - Ямки с DNA библиотеки TSO Comprehensive (EU) – 5 µl OPD2 (бяла капачка) към всяка библиотека, получена от DNA, за обогатяване на TSO Comprehensive (EU).
7. Нанесете залепващо уплътнение върху HYB1 PCR плаката.



ВНИМАНИЕ

Уверете се, че сте запечатали добре ръбовете и ямките, за да предотвратите изпаряване.

8. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
9. Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата за HYB1.
Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).
10. Хибридизирайте при 57°C в продължение на поне 8 часа до най-много 24 часа.
11. Върнете хибридизационните реагенти за съхранение.
12. Съхранявайте ALS PCR плаката при -25°C до -15°C в продължение на до 30 дни.

Подготовка за стъпките на протокола

1. В началото на ден 2 извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (част № 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
SMB (тъмносин етикет)	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура в продължение на 30 минути.	Целево улавяне – първа част Целево улавяне – втора част
ET2	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Целево улавяне – първа част Целево улавяне – втора част
HP3	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Целево улавяне – първа част Целево улавяне – втора част Нормализиране на библиотеките
TCB1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Настройване на втората хибридизация
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Целево улавяне – втора част Изчистване на усилена обогатена библиотека

Таблица 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (част № 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
EE2	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Целево улавяне – първа част Целево улавяне – втора част Нормализиране на библиотеките
EEW	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Целево улавяне – първа част
TCA1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на втората хибридизация

Таблица 28 Анализ Content Set Box (част № 20031122)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
OPR1 (червена капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на втората хибридизация

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
OPD2 (бяла капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Настройване на втората хибридизация

Целево улавяне – първа част

На този етап се използва SMB за улавяне на сонди, хибридизирани в целевите области, които са обект на интерес. Топчетата се измиват три пъти с EEW. Обогащените библиотеки се елуират с прясна елуирана смес от EE2 + HP3 и неутрализират с ET2.

Подготовка

1. Предварително загрейте инкубатор за микропроби с MIDI термоблокова вложка до 57°C.
2. Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - EEW – Вортексирайте, за да се смесят, в продължение на 1 минута.
 - EE2 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - HP3 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - SMB – Уверете се, че топчетата са били на стайна температура за 30 минути. Не забравяйте да използвате **SMB**, а не SPB при тази процедура.
 - ET2 – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
3. Подгответе прясна смес за елуиране EE2 + HP3 в епруветка за микроцентрофуга.

Таблица 29 Смес за елуиране EE2 + HP3 за Целево улавяне – първа част

Компонент за елуиране на смес	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте [Работа с реагенти на страница 35](#) за изчисления.

4. Вортексирайте сместа за елуиране EE2 + HP3 и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана за стъпката [Елуиране на страница 66](#).
5. Поставете етикет CAP1 (улавяне 1) на нова 96-ямкова MIDI плака.
6. Поставете магнита.

Процедура

Свързване

1. Отстранете HYB1 PCR плаката от термоциклера.
2. Центрофугирайте HYB1 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.

3. Вortexируйте SMB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
4. Незабавно добавете 150 µl SMB към всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI.
Ако използвате ваничка за дозиране на SMB, включете коефициент на излишък от 1,15, когато аликвотираете достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SMB бъде добавен към всяка ямка за проба.
5. Настройте пипетата на 50 µl и прехвърлете целия обем на всяка библиотека от HYB1 PCR плаката в съответната ямка на плаката CAP1 MIDI.
6. Изхвърлете празната HYB1 PCR плака.
7. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
8. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
9. Инкубирайте в предварително загрят инкубатор за микропроби при 57°C за 25 минути.
10. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
11. Като държите плаката CAP1 MIDI върху магнитната стойка, използвайте пипета P200 с настройка за 200 µl, за да отстраните и изхвърлите всички супернатант, без да размествате гранулата.



ВНИМАНИЕ

Пристъпете незабавно към следващата стъпка ([Измиване на страница 66](#)). Не оставяйте гранулата да престоива продължително време без наличие на течност.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Отстранете CAP1 MIDI плаката от магнитната стойка.
 - b. Добавете 200 µl EEW към всяка ямка.
 - c. Настройте обема на пипетата на 150 µl и пипетирайте, за да разбъркате минимум 10 пъти.
Уверете се, че всички топчета са повторно суспендирани.



ВНИМАНИЕ

Уверете се, че няма гранули, като внимателно аспирирате общия разтвор на топчетата от ямката в крайника. След това потърсете гранула на дъното на всяка ямка. Наклонете крайника на пипетата към гранулата по време на стъпките за измиване, за да изтласкате гранулата. Уверете се, че гранулата е напълно покрита в разтвор. Разтворът трябва да изглежда тъмнокафяв и да има хомогенна консистенция.

- d. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI.
 - e. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
 - f. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 4 минути.
 - g. Инкубирайте в инкубатор за микропроби при 57°C за 5 минути.
 - h. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
 - i. Задръжте върху магнитната стойка и отстранете и изхвърлете всички супернатант от всяка ямка, без да размествате гранулата.
2. Измийте топчетата *втори* път.
 3. Измийте топчетата *трети* път.
 4. Премахнете остатъчния супернатант от всяка ямка.
Използвайте пипета P20 с фини крайници.

Елуиране

1. Отстранете CAP1 MIDI плаката от магнитната стойка.
2. Вортексирайте прясна смес за елуиране EE2 + HP3 и след това центрофугирайте за кратко.
3. Внимателно добавете 17 µl смес за елуиране EE2 + HP3 към всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI.
4. Изхвърлете останалата смес за елуиране EE2 + HP3.
5. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
6. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
7. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
8. Поставете етикет ELU1 (елуиране 1) на нова 96-ямкова PCR плака.

9. Вортексирайте ET2, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
10. Добавете 5 µl ET2 във всяка съответна ямка с библиотека в новата плака ELU1 PCR.
11. Внимателно прехвърлете 15 µl елуат от всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI в съответната ямка на плаката ELU1 PCR.
12. Изхвърлете празната плака CAP1 MIDI.
13. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката ELU1 PCR.
14. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
15. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
16. Върнете EEW за съхранение.

Настройване на втората хибридизация

При тази стъпка целевите региони от обогатените библиотеки със cDNA и/или gDNA се свързват за втори път със сонди за улавяне. Втората хибридизация осигурява висока специфичност на уловените региони. За да се осигури оптимално обогатяване на библиотеките, извършете втората стъпка на хибридизация при 57°C в продължение на поне 1,5 часа до най-много 4 часа.

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - TCB1 – Загрейте епруветката при 37°C в продължение на 5 минути. Вортексирайте за 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - TCA1 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - OPR1 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - OPD2 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.

Процедура

1. Проверете TCB1 за утайки. Ако има кристали, загрейте епруветката отново и вортексирайте, докато кристалите се разтворят.
2. Добавете 15 µl TCB1 към всяка ямка на библиотека на плаката ELU1 PCR.
3. Добавете 10 µl TCA1 към всяка ямка на библиотека.
4. Добавете сонди.

Не комбинирайте различни типове сонди.

 - Ямки с RNA библиотеки – 5 µl OPR1 (червена капачка) към всяка библиотека, получена от RNA.
 - Ямки с DNA библиотеки TSO Comprehensive (EU) – 5 µl OPD2 (бяла капачка) към всяка библиотека, получена от DNA, за обогатяване на TSO Comprehensive (EU).
5. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката ELU1 PCR.

Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.

- Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
- Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата HYB2.
Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).
- Хибридирайте при 57°C в продължение на поне 1,5 часа до най-много 4 часа.
- Върнете хибридационните реагенти за съхранение.

Целево улавяне – втора част

На този етап се използва SMB за улавяне на сонди, хибридизирани в целевите области, които са обект на интерес. Топчетата се измиват един път с RSB. Обогащените библиотеки се елуират с прясна елуирана смес от EE2 + HP3 и неутрализират с ET2.

Подготовка

- Предварително загрейте инкубатор за микропроби с MIDI термоблокова вложка до 57°C.
- Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - EE2 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - HP3 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - SMB – Уверете се, че топчетата са били на стайна температура за 30 минути.
Не забравяйте да използвате **SMB**, а не SPB при тази процедура.
 - RSB – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
 - ET2 – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- Подгответе прясна смес за елуиране EE2 + HP3 в епруветка за микроцентрифуга.

Таблица 30 Смес за елуиране EE2 + HP3 за целево улавяне – втора част

Компонент за елуиране на смес	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте [Работа с реагенти на страница 35](#) за изчисления.

- Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана за стъпката [Елуиране на страница 70](#).
- Поставете етикет CAP2 (улавяне 2) на нова 96-ямкова MIDI плака.
- Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- Отстранете ELU1 PCR плаката от термоциклера.

2. Центрофугирайте ELU1 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
3. Вортексирайте SMB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
4. Незабавно добавете 150 µl SMB към всяка ямка за библиотека на плаката CAP2 MIDI.
Ако използвате ваничка за дозиране на SMB, включете коефициент на излишък от 1,15, когато аликвотирате достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SMB бъде добавен към всяка ямка за проба.
5. Настройте пипетата на 50 µl и прехвърлете целия обем на всяка библиотека от плаката ELU1 PCR в съответната ямка на плаката CAP2 MIDI.
6. Изхвърлете празната ELU1 PCR плака.
7. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
8. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
9. Инкубирайте в инкубатор за микропроби при 57°C за 25 минути.

ЗАБЕЛЕЖКА Ако продължите с [Усилване на обогатена библиотека на страница 71](#), следвайте инструкциите за размразяване на реагентите в раздела Подготовка за стъпките на протокола.

10. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
11. Задръжте плаката CAP2 MIDI върху магнитната стойка и използвайте пипета P200 с настройка за 200 µl, за да отстраните и изхвърлите всички супернатант от всяка ямка с библиотека, без да размествате гранулата.



ВНИМАНИЕ

Пристъпете незабавно към следващата стъпка ([Измиване на страница 69](#)). Не оставяйте гранулата да престоива продължително време без наличие на течност.

Измиване

1. Отстранете плаката CAP2 MIDI от магнитната стойка.
2. Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
3. Добавете 200 µl RSB към всяка ямка.
4. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
5. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 4 минути.
6. Поставете на магнитната стойка за 2 минути.
7. Задръжте плаката CAP2 MIDI върху магнитната стойка и отстранете и изхвърлете всички супернатант от всяка ямка, без да размествате гранулата.
8. Премахнете остатъчния супернатант от всяка ямка.

Използвайте пипета P20 с фини накрайници.

Елуиране

1. Отстранете плаката CAP2 MIDI от магнитната стойка.
2. Вортексирайте прясна смес за елуиране EE2 + HP3 и след това центрофугируйте за кратко.
3. Добавете 22 µl смес за елуиране EE2 + HP3 към всяка ямка с библиотека на плаката CAP2 MIDI.
4. Изхвърлете останалата смес за елуиране EE2 + HP3.
5. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
6. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
7. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
8. Поставете етикет ELU2 (елуиране 2) на нова 96-ямкова PCR плака.
9. Вортексирайте ET2, за да се смеси, и след това центрофугируйте за кратко.
10. Добавете 5 µl ET2 във всяка съответна ямка с библиотека в новата плака ELU2 PCR.
11. Внимателно прехвърлете 20 µl елуат от всяка ямка с библиотека на плаката CAP2 MIDI в съответната ямка на плаката ELU2 PCR.
12. Изхвърлете празната плака CAP2 MIDI.
13. Добавете залепващо уплътнение за плака към плаката ELU2 PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
14. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
15. Върнете SMB, EE2, HP3 и ET2 на съхранение.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугируйте ELU2 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 7 дни. Върнете RSB за съхранение.

Подготовка за стъпките на протокола

1. Пригответе кофа с лед.
2. Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (част № 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
PPC3	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Усилване на обогатена библиотека
ERM	-25°C до -15°C	Задръжте върху лед.	Усилване на обогатена библиотека

Таблица 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (част № 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
SPB (светлозелен етикет)	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура в продължение на 30 минути.	Изчистване на усилена обогатена библиотека
RSB	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Изчистване на усилена обогатена библиотека Приготвяне за секвениране

Усилване на обогатена библиотека

Тази стъпка използва праймери, за да усилите обогатените библиотеки.

Подготовка

1. Ако ELU2 плаката е била съхранявана, размразете до стайна температура и след това конфигурирайте на 280 × g за 1 минута.

Процедура

1. Вортексирайте PPC3, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
2. Добавете 5 µl PPC3 към всяка ямка на библиотека на ELU2 PCR плаката.
3. Вортексирайте EPM за 5 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
4. Добавете 20 µl EPM към всяка ямка на библиотека.
5. Добавете залепващо уплътнение за плака към плаката ELU2 PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
6. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
7. Поставете термоциклер и стартирайте програмата EL-PCR.
Направете справка в [Програмни термоциклери на страница 44](#).

Забележка Ако продължавате с [Нормализиране на библиотеките на страница 74](#), следвайте инструкциите за размразяване в раздела Подготовка за стъпките на протокола.

8. Върнете PPC3 и EPM за съхранение.

Изчистване на усилена обогатена библиотека

Този процес използва SPB, за да почисти обогатените библиотеки от компоненти с нежелани реакции. Топчетата се измиват два пъти в пресен 80% етанол. Библиотеките се елуират с RSB.

Подготовка

- Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - SPB – Уверете се, че топчетата са на стайна температура за 30 минути. Уверете се, че използвате **SPB**, а не SMB за тази процедура.
 - RSB – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- Пригответе пресен 80% етанол в конична епруветка от 15 ml или 50 ml.

Таблица 33 Пригответе пресен 80% етанол

Реагент	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
100% етилов алкохол, чист	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Вода без RNase/DNase	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Вортексирайте пресен 80% EtOH за смесване.
- Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака BIND2 (свързваща при почистване).
- Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- Отстранете ELU2 PCR плаката от термоциклера.
- Центрофугирайте ELU2 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
- Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
- Незабавно добавете 110 µl SPB към всяка ямка за библиотека на BIND2 MIDI плака.
- Прехвърлете 50 µl от всяка библиотека от ELU2 PCR плака в съответната ямка на BIND2 MIDI плака.
- Изхвърлете празната ELU2 PCR плака.
- Добавете залепващ уплътнител към BIND2 MIDI плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
- Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
- Поставете на магнитна стойка за 5 минути.
- Използвайте P200 пипета, настроена на 200 µl, за да отстраните и изхвърлите *целия* супернатант от всяка ямка за библиотека, без да се нарушавате гранулата.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Оставете на магнитната стойка и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка.
 - b. Изчакайте 30 секунди.
 - c. Отстранете и изхвърлете целия супернатант от всяка пробна ямка, без да се нарушава гранулата.
2. Измийте топчетата *втори* път.
3. Премахнете остатъчния EtOH от всяка ямка.
Използвайте пипета P20 с фини накрайници.
4. Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

1. Отстранете BIND2 MIDI плаката от магнитната стойка.
2. Обърнете или вортексирайте за смесване на RSB.
3. Добавете 32 µl RSB към всяка ямката на всяка библиотека.
4. Добавете залепващ уплътнител към BIND2 MIDI плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
5. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
6. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
7. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
8. Етикетирайте нова 96-ямкова PCR плака PL (Пречистени библиотеки).
9. Прехвърлете 30 µl от всеки елуат от BIND2 MIDI плаката в съответната ямка на PL PCR плаката.
10. Изхвърлете празната BIND2 MIDI плака.
11. Добавете залепващо уплътнение за плака към PL PCR плаката.
12. Върнете SPB за съхранение.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугирайте PL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 30 дни. Върнете RSB за съхранение.

Подготовка за стъпките на протокола

1. Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (част № 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
LNA1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Нормализиране на библиотеките
EE2	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Нормализиране на библиотеките

Таблица 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (част № 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
LNB1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура в продължение на 30 минути.	Нормализиране на библиотеките
HP3	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Нормализиране на библиотеките Приготвяне за секвениране
LNW1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Нормализиране на библиотеките
LNS1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Нормализиране на библиотеките

2. Ако на същия ден продължавате с [Приготвяне за секвениране на страница 79](#), следвайте инструкциите за размразяване в раздела Подготовка за стъпките на протокола.

Нормализиране на библиотеките

Този процес използва LNB1 и добавки (LNA1), за да нормализира количеството във всяка библиотека и да осигури единно изображение на библиотеките в обединените библиотеки. Топчетата се измиват два пъти с LNW1. Библиотеките се елуират с прясна елуирана смес от EE2 + HP3 и неутрализират с LNS1.

Подготовка

- Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - LNB1 – Уверете се, че топчетата са оставени на стайна температура за 30 минути.
 - LNA1 – Вортексирайте, за да се смесят.
 - EE2 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугируйте за кратко.
 - HP3 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугируйте за кратко.
 - LNW1 – Вортексирайте, за да се смесят. Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
 - LNS1 – Вортексирайте, за да се смесят. Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- Вортексирайте LNB1 за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.

Обърнете епруветката LNB1, за да сте сигурни, че всички топчета са повторно суспендирани.

- С помощта на P1000, настроена на 800 µl, пипетирайте LNB1 нагоре и надолу 10 пъти, за да осигурите повторно суспендиране.
- Незабавно пригответе прясна основна смес LNA1 + LNB1 в конична епруветка.



ВНИМАНИЕ

Напълно ресуспендирайте гранулата LNB1 на дъното на епруветката, за да предотвратите непостоянна плътност на клъстерите.

Таблица 36 Основна смес LNA1 + LNB1

Компонент на основна смес	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте [Работа с реагенти на страница 35](#) за изчисления.

- Вортексирайте основната смес LNA1 + LNB1. Оставете настрана за стъпката [Свързване на страница 75](#).
- Подгответе прясна смес за елуиране EE2 + HP3 в епруветка за микроцентрифуга.

Таблица 37 Смес за елуиране EE2 + HP3 за нормализиране на библиотеки

Компонент за елуиране на смес	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Тази таблица включва надвишаване на обема. Вижте [Работа с реагенти на страница 35](#) за изчисления.

- Вортексирайте прясна смес за елуиране и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана за стъпката [Елуиране на страница 76](#).
- Ако плаката PL PCR е била съхранявана, размразете до стайна температура, центрофугирайте при 280 × g за 1 минута и след това пипетирайте, за да смесите.
- Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака BBN (Нормализация, базирана на топчета).
- Поставете магнита.

Процедура

Свързване

- Вортексирайте основната смес LNA1+LNB1.
- Незабавно добавете 45 µl основна смес LNA1 + LNB1 към всяка ямка за библиотека на BBN MIDI плаката.
- Изхвърлете останалата основна смес LNA1 + LNB1.
- Добавете 20 µl от всяка библиотека от PL PCR плаката към съответната ямка от BBN MIDI плаката.

5. Добавете залепващ уплътнител за плака към BBN MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
6. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 30 минути.
7. Нанесете залепващ уплътнител за плака към PL PCR плаката и върнете за съхранение.
8. Поставете плаката на магнитна стойка за 2 минути.
9. Задръжте на магнитна стойка и използвайте P200 пипета, за да отстраните и изхвърлите всички супернатант от всяка ямка, без да се нарушава гранулата.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Отстранете BBN MIDI плаката от магнитната стойка.
 - b. Добавете 45 µl LNWI към всяка ямка на библиотека.
 - c. Добавете залепващ уплътнител за плака към BBN MIDI плаката.
 - d. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
 - e. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 5 минути.
 - f. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
 - g. Отстранете и изхвърлете всички супернатант от всяка ямка, без да се нарушава гранулата.
2. Измийте топчетата *втори* път.
3. Премахнете остатъчния супернатант от всяка ямка. Използвайте пипета P20 с фини крайници.

Елуиране

1. Отстранете BBN MIDI плаката от магнитната стойка.
2. Вортексирайте прясна смес за елуиране EE2 + HP3 и след това центрофугирайте за кратко.
3. Добавете 32 µl EE2 + HP3 разтвор към всяка ямка с библиотека на BBN MIDI плаката.
4. Изхвърлете останалата смес за елуиране.
5. Добавете залепващ уплътнител за плака към BBN MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
6. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
7. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
8. Етикетирайте нова 96-ямкова PCR плака NL (Нормализирани библиотеки).
9. Внимателно прехвърлете 30 µl елуат от всяка библиотечна ямка на BBN MIDI плаката в съответната ямка на NL PCR плаката.

**ВНИМАНИЕ**

Ако топчетата се аспирират във върховете на пипетата, разпределете ги обратно върху плаката на магнитната стойка и изчакайте, докато течността се избистри (~2 минути), преди да продължите със следващата стъпка от процедурата.

10. Изхвърлете празната BBN MIDI плака.
11. Вортексирайте LNS1, за да се смесят.
12. Добавете 30 µl LNS1 към всяка библиотечна ямка в новата NL PCR плака.
13. Пипетирайте, за да смесите, пет пъти.
14. Добавете залепващ уплътнител за плака към NL PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
15. Върнете LNB1, LNA1, EE2, LNW1 и LNS1 за съхранение.

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 30 дни.

Подготовка за стъпките на протокола

Започнете подготовката на консумативите за секвениране от NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (част № 20028871) поне един час преди употреба.

1. Извадете буфера за разреждане на библиотеки (HT1) от съхранение на температура от -25°C до -15°C, размразете го до стайна температура и след това го поставете върху лед.
2. Следвайте инструкциите за приготвяне в *Справочното ръководство за инструмента NextSeq 550Dx (документ № 100000009513)* за другите консумативи в комплекта.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
3. Извадете епруветката с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

Таблица 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (част № 20031121)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
PhiX Internal Control (PX3 или PhiX)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура. Задръжете върху лед.	Приготвяне за секвениране

Таблица 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (част № 20031123)

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
HP3	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Приготвяне за секвениране
RSB (розов етикет)	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Приготвяне за секвениране

Приготвяне за секвениране

Подготовка

1. Прегледайте насоките в [Брой библиотеки и подбор на индекси на страница 38](#).
2. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка dHP3 (разреден HP3).
3. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка dPhiX (разреден PhiX).
4. Загрейте топлинния блок до 96°C за микроцентрифужните епруветки.
5. Пригответе кофа с лед.

Разреждане и денатуриране на контролата PhiX

1. Вортексирайте HP3, за да се смеси и след това центрофугирайте за кратко.
2. Комбинирайте следните обеми в епруветката за микроцентрифугиране на dHP3.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl вода без RNase/DNase
3. Вортексирайте dHP3, за да се смеси и след това центрофугирайте за кратко.
4. Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
5. Вортексирайте PhiX контрола, за да се смеси и след това центрофугирайте за кратко.
6. Комбинирайте следните обеми в епруветката за микроцентрифугиране на dPhiX.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX контрола
7. Добавете 10 µl dHP3 към епруветката на dPhiX.
8. Изхвърлете епруветката от dHP3.
9. Вортексирайте епруветката dPhiX, за да се смеси и след това центрофугирайте за кратко.
10. Инкубирайте dPhiX на стайна температура в продължение на 5 минути за денатуриране.
11. Вортексирайте HT1, за да се смеси.
12. Незабавно добавете 980 µl предварително охладен HT1 към dPhiX.
13. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
14. Поставете dPhiX върху лед до употреба в подготовката за второто разреждане.
Крайната концентрация е 20 pM dPhiX.
15. Върнете PhiX, HP3 и RSB за съхранение.

Пулиране и денатуриране на библиотеки за TSO Comprehensive (EU)

1. Ако NL PCR плаката е била съхранявана, размразете до стайна температура и след това центрофугирайте плаката на 280 × g за 1 минута.

2. Като използвате многоканална пипета, настроена на 30 µl, внимателно смесете с пипета библиотеките в плаката NL PCR пет пъти.

Използвайте нови накрайници за всяка библиотека.



ВНИМАНИЕ

Уверете се, че сте разбъркали добре библиотеките за оптимална производителност.

3. Изберете една от следните опции за пулиране, денатуриране и разреждане на библиотеките.
 - **Опция № 1:** Едновременно секвенирайте библиотеки, получени от RNA проби и DNA проби. Вижте [Опция № 1: Съвместно използване на DNA и RNA библиотеки на страница 80](#).
 - **Опция № 2:** Секвениране на библиотеки, получени само от DNA проби. Вижте [Опция № 2: Само библиотеки с DNA на страница 81](#).
 - **Опция № 3:** Секвениране на библиотеки, получени само от RNA проби. Вижте [Опция № 3: Библиотеки само RNA на страница 82](#).

Опция № 1: Съвместно използване на DNA и RNA библиотеки

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка PRL (Пулирани RNA библиотеки).
2. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка PDL (Пулирани DNA библиотеки).
3. Прехвърлете по 10 µl от всяка нормализирана RNA (сDNA) библиотека от NL плаката в PRL епруветката.
Не пулирайте две библиотеки с един и същ индексен праймер.
4. Прехвърлете по 10 µl от всяка нормализирана DNA библиотека от NL плаката в PDL епруветката.
Не пулирайте две библиотеки с един и същ индексен праймер.
5. Добавете залепващ уплътнител за плака към NL PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
6. Вортексирайте PRL и PDL епруветките, за да се смесят.
7. Центрофугирайте PRL и PDL епруветките за кратко.
8. Инкубирайте PRL и PDL епруветките с помощта на термоблок на 96°C за 2 минути.
9. Поставете PRL и PDL епруветките върху лед за 5 минути.
10. Вортексирайте PRL и PDL епруветките, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
11. Върнете PRL и PDL епруветките върху леда.

Приготвяне на първото разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка DIL1 (разреждане 1).
2. Прехвърлете 20 µl от PDL в празната епруветка DIL1.
3. Добавете 5 µl от PRL в DIL1.
4. Изхвърлете епруветките PDL и PRL.

5. Добавете 475 µl предварително охладен НТ1 в епруветката DIL1 (разреждане 1:20).
6. Вортексирайте DIL1 епруветката, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Приготвяне на второто разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка от 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
2. Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.
3. Изхвърлете епруветката DIL1.
4. Добавете 1660 µl предварително охладен НТ1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:850).
5. Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
6. Добавете 2,5 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
7. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
8. Заредете 1300 µl от DIL2 в размразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
За повече информация вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.
9. Изхвърлете епруветката DIL2.
10. Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период от до 30 дни.
11. Пристъпете към секвенирането.
За повече информация вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.

Опция № 2: Само библиотеки с DNA

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка PDL (Пулирани DNA библиотеки) с капак на винт.
2. Прехвърлете по 10 µl от всяка нормализирана DNA библиотека от NL плаката в PDL епруветката. Не пулирайте две библиотеки с един и същ индексен праймер.
3. Добавете залепващ уплътнител за плака към NL PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
4. Нанесете Microseal „B“ върху NL PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
5. Вортексирайте PDL епруветката, за да се смеси.
6. Центрофугирайте PDL епруветката за кратко.
7. Инкубирайте PDL епруветката с помощта на термоблок на 96°C за 2 минути.
8. Поставете PDL епруветката върху лед за 5 минути.
9. Вортексирайте PDL епруветката, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
10. Върнете PDL епруветката върху леда.

Приготвяне на първото разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка DIL1 (разреждане 1).
2. Прехвърлете 10 µl от PDL в празната епруветка DIL1.
3. Изхвърлете епруветката PDL.
4. Добавете 190 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL1 (разреждане 1:20).
5. Вортексирайте DIL1, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Приготвяне на второто разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка от 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
2. Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.
3. Изхвърлете епруветката DIL1.
4. Добавете 1660 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:850).
5. Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX и след това центрофугирайте за кратко.
6. Добавете 2,5 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
7. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
8. Заредете 1300 µl от DIL2 в размразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
За повече информация вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.
9. Изхвърлете епруветката DIL2.
10. Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и след това съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 30 дни.
11. Пристъпете към секвенирането.
За повече информация вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.

Опция № 3: Библиотеки само RNA

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка PRL (Пулирани RNA библиотеки).
2. Прехвърлете по 10 µl от всяка нормализирана RNA (сDNA) библиотека от NL плаката в PRL епруветката.
Не пулирайте две библиотеки с един и същ индексен праймер.
3. Добавете залепващ уплътнител за плака към NL PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
4. Вортексирайте PRL епруветката, за да се смеси.
5. Центрофугирайте PRL епруветката за кратко.
6. Инкубирайте PRL епруветката с помощта на термоблок на 96°C за 2 минути.

7. Поставете PRL епруветката върху лед за 5 минути.
8. Вортексирайте PRL епруветката, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
9. Върнете PRL епруветката върху леда.

Приготвяне на първото разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка DIL1 (разреждане 1).
2. Прехвърлете 10 µl от PRL в празната епруветка DIL1.
3. Изхвърлете епруветката PRL.
4. Добавете 190 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL1 (разреждане 1:20).
5. Вортексирайте DIL1, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Приготвяне на второто разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка от 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
2. Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.
3. Изхвърлете епруветката DIL1.
4. Добавете 1646 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:843).
5. Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX и след това центрофугирайте за кратко.
6. Добавете 16,7 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
7. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
8. Заредете 1300 µl от DIL2 в размразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles).
За повече информация вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.
9. Изхвърлете епруветката DIL2.
10. Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период от до 30 дни.
11. Пристъпете към секвенирането.
За повече информация вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.

Интерпретиране на резултатите

Резултатите от секвенирането от анализа TSO Comprehensive (EU) се отчитат за всяка проба поотделно в PDF отчет и JSON отчет. Отчет за ниска дълбочина (`LowDepthReport.tsv`) също се генерира на ниво проба.

На ниво изпълнение се генерират следните изходни файлове:

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

В PDF и JSON отчетите се показват само варианти, които преминават контрол на качеството.

За подробна информация за анализа вижте Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661).

Резултати от съвместна диагностика

За всяко предназначение на съвместна диагностика (CDx) има три възможни резултата:

- **Положителен** – Открива се вариант и се класифицира като ниво 1 (CDx).
- **Не се открива** – В пробата не са открити варианти или биомаркери, свързани с предназначението на CDx. Типът тумор, избран за пробата, е подходящ за CDx.
- **Няма резултат** – Определянето на състояние на вариант не е възможно поради една или повече от следните причини:
 - Предназначението на CDx не е приложимо за тестваната проба, тъй като типът тумор, избран за пробата, не е подходящ за туморния тип на CDx.
 - Изпълняването на секвениране е неуспешно в спецификациите за качествен контрол.
 - Библиотеката не отговаря на изискваните спецификации за контрол на качеството.
 - Подходящата нуклеинова киселина не е изпълнена.

Всички резултати от предназначението на CDx се отчитат в раздела Companion Diagnostic Results (Резултати от съвместна диагностика) на JSON отчета. Само предназначенията с положителен резултат са изброени в раздела Companion Diagnostic Results (Резултати от съвместна диагностика) на PDF отчета.

Варианти за профилиране на тумори

TSO Comprehensive (EU) е създаден за отчитане на соматични варианти, когато се отчитат варианти с доказателство за клинично значение или варианти с потенциално клинично значение. Софтуерът за анализ TSO Comprehensive (EU) използва БЗ, която определя дали всеки открит и допустим вариант ([Таблица 2](#)) е с клинично значение или с потенциално клинично значение въз основа на доказателства за

терапевтични, диагностични или прогностични асоциации. БЗ също така взема предвид дали са установени (или не) асоциации в тествания тип тумор. Асоциациите за предразположеност към или риск от рак не са включени в БЗ. Често срещани полиморфизми са премахнати.

За варианти за профилиране на тумор положителните резултати се класифицират в Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance (Геномни находки с доказателства за клинично значение) или Genomic Findings with Potential Clinical Significance (Геномни находки с потенциално клинично значение) според инсталираната БЗ и идентифицирания тип тумор.

Неуспехите в контрола на качеството не водят до никакви резултати за типовете варианти, които са от значение за неуспешния показател за контрол на качеството. Вижте [Таблица 40](#) и [Таблица 41](#) за повече информация. Позициите за профилиране на тумори с недостатъчна дълбочина са изброени в отчета за ниска дълбочина, а не в отчета TSO Comprehensive (EU).

Качествен контрол

- За информация за количествено определяне на нуклеинова киселина и минимални изисквания за входен материал вижте [Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27](#).
- Изпълняването на секвениране и валидността на пробата се определят автоматично и се отчитат от Модул за анализ TSO Comprehensive (EU). За подробна информация за анализа вижте Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661).

Таблица 40 Показатели на КК на резултати от отчета TSO Comprehensive (EU)

Тип изход	Измерване	Спецификация	Описание	Влияние на неуспех на спецификацията*
Изпълняване на секвениране	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Процент на разчитания, преминаващи филтър (PF).	Изпълняването на секвениране е невалидирано, няма отчетени резултати за която и да е проба в изпълняване.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Средният процент на базови обозначения с резултат за качество Q30 или повече за Разчитане 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Средният процент на базови обозначения с резултат за качество Q30 или повече за Разчитане 2.	

Тип изход	Измерване	Спецификация	Описание	Влияние на неуспех на спецификацията*
DNA библиотеки	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 ИЛИ > 3106 и P_VALUE $\leq 0,049$	Измерване, което оценява вероятността за контаминация, като използва VAF на често срещани варианти. Резултатът за контаминация е базиран на разпределението на VAF за SNP. Р-стойността на контаминацията, използвана за оценка на високопренаредени геноми, приложима само когато резултатът за контаминация е над горната граница на спецификация.	Няма отчетени DNA резултати.

Тип изход	Измерване	Спецификация	Описание	Влияние на неуспех на спецификацията*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Средната дължина на фрагмента в пробата.	Няма отчетени резултати за TMB или малки варианти на DNA.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (количество)	≥ 150	Средно покритие на фрагменти на екзона сред всички бази на екзона.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Процент екзонни бази с покритие на фрагмента 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (количество)	≥ 40	Броят на MSI места, които може да се използват за MSI обозначаване (Брой на микросателитните места с достатъчно обхващащи разчитания за идентифициране на микросателитна нестабилност).	Няма отчетени MSI резултати.
	COVERAGE_MAD (количество)	$\leq 0,210$	Средната стойност на абсолютните отклонения от средната стойност на нормализирания брой на всеки CNV целеви регион.	Няма отчетени резултати за гена амплификация.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (количество)	$\geq 1,0$	Средната стойност на необработения брой пакети за CNV цел.	

Тип изход	Измерване	Спецификация	Описание	Влияние на неуспех на спецификацията*
RNA библиотеки	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	$\geq 80,0$	Средната дължина на фрагмента в пробата.	Няма отчетени резултати за сливания или сплайс варианти.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (коефициент)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X е мярка за еднородност на покритието. За всеки ген с покритие най-малко 500x коефициентът на вариация в покритието по тялото на гена е изчислен. Това измерване е медианата на тези стойности. Висока стойност посочва високо ниво на вариация и посочва проблем в приготвянето на библиотеката, като например ниско въвеждане на проба и/или проблеми с утаяване със сонда. Това измерване се изчислява, като се използват всички разчитания (включително разчитания, отбелязани като дублирани).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (количество)	$\geq 9\,000\,000$	Общият брой разчитания, които картографират целевите региони. Това измерване се изчислява, като се използват всички разчитания (включително разчитания, отбелязани като дублирани).	

* Успешните резултати показват PASS (ПРЕМИНАВА).

Таблица 41 Контролни показатели на резултати от отчета TSO Comprehensive (EU)

Тип изход	Измерване	Спецификация	Влияние на неуспех на спецификацията*
Положителна контрола	DNA външна контрола	Открити са 23 от 24 посочени варианта	Ръчно анулирайте пробите на пациентите въз основа на резултатите от контролните проби. Софтуерът на модула за анализ не анулира
	RNA външна контрола	Открити са 12 от 13 посочени варианта	автоматично проби от пациенти въз основа на резултатите от контролните проби.
Контрола без шаблон	DNA средно покритие на екзон за TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Ръчно анулирайте пробите на пациентите въз основа на резултатите от контролните проби. Софтуерът на модула за анализ не анулира
	RNA ген над средната граница	≤ 1	автоматично проби от пациенти въз основа на резултатите от контролните проби.

* Успешните резултати показват PASS (ПРЕМИНАВА).

- Отчетът TSO Comprehensive (EU), който е наличен във формати PDF и JSON, обобщава резултатите от контрола на качеството. Отчетите са в папката за анализ. Вижте Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661) за местоположението на папката за анализ (съдържа PDF и JSON отчети) и папката за изпълнение.
- Повторете изпълняванията на секвениране, които са невалидни.
- Повторете тестовете на библиотеки със следните резултати:
 - Замърсени DNA библиотеки
 - Невалидни RNA библиотеки
 - Тестовете могат да бъдат повторени, за да се получат повече резултати за варианти или биомаркери за DNA библиотеки, които са били анулирани за един, но не за всички типове варианти.
- Положителните контроли се оценяват за обозначаване на вариант. Ако положителните контроли не отговарят на спецификациите за обозначаване на варианта, анулирайте ръчно изпълняването на секвениране. Софтуерът на модула за анализ не анулира автоматично проби от пациенти въз основа на резултатите от контролните проби.
- NTC се оценяват спрямо средното покритие на екзон за DNA и гени над средната граница за RNA. Ако отрицателните контроли не отговарят на спецификациите, анулирайте ръчно събитието за приготвяне на библиотеката и всички свързани изпълнявания на секвениране. Софтуерът на модула за анализ не анулира автоматично проби от пациенти въз основа на резултатите от контролните проби.

- Извършете допълнителни мерки за контрол на качеството в съответствие с местните, щатските и/или федералните разпоредби или изискванията за акредитация.

За повече информация относно повтарящи се изпълнявания на секвениране или тестове на библиотеки, вижте [Отстраняване на неизправности на страница 91](#).

Отстраняване на неизправности

Използвайте таблицата по-долу, за да отстраните проблема в работния процес. Ако изпълняването на секвениране или приготвянето на библиотеката за проба са неуспешни два пъти, може да е необходимо допълнително отстраняване на неизправности. Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
Изпълняването на секвениране не преминава спецификациите за контрол на качеството	Грешка при използване или лабораторно оборудване в работния процес на анализа	<p>Повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване.</p> <ul style="list-style-type: none"> Секвенирайте повторно библиотеките от PCR плаката за нормализация на библиотеки (NL). Вижте Приготвяне за секвениране на страница 79. Обогатете отново библиотеките от PCR плаката с проби на усиленни библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 61. Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Денатуриране и отгряване на RNA на страница 47 или Фрагментиране на gDNA на страница 52.
	Проблем с инструмента	Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
Грешка при генериране на отчет или обща грешка в инструмента (мрежова грешка, грешки при зареждане/извеждане на реагенти и т.н.)	Проблем със софтуера или инструмента	Вижте Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661) за помощ при генериране на отчети. Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina за допълнителна помощ.
DNA библиотеката не преминава спецификациите за контрол на качеството	Изискванията за въвеждане на проба не бяха изпълнени	Осигурете подходящо въвеждане на пробата и повторете приготвянето на библиотеката от стъпката на фрагментиране на gDNA. Вижте Изисквания за пробите на страница 27 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27 .
	Грешка при използване или оборудване в работния процес на анализа	Повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване. <ul style="list-style-type: none"> Секвенирайте повторно библиотеките от PCR плаката за нормализация на библиотеки (NL). Вижте Приготвяне за секвениране на страница 79. Обогатете отново библиотеките от PCR плаката с проби на усиленни библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 61. Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Фрагментиране на gDNA на страница 52.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
DNA библиотеката не преминава спецификациите за контрол на качеството (продължение)	Критериите за CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE не са изпълнени	<p>Прегледайте „Предупреждения и предпазни мерки“ за информацията относно избягването на кръстосано замърсяване.</p> <p>Прегледайте оформлението на плаката и индексирването на библиотеката, за да се уверите, че библиотеки с един и същи индекс не са секвенирани заедно.</p> <p>За засегнатите библиотеки започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Фрагментиране на gDNA на страница 52.</p> <p>Може да е настъпило замърсяване по време на извличането на пробата. Може да се наложи повторно извличане, за да е сигурно, че пробата не е замърсена.</p>
	Използваемият MSI е неуспешен	<p>Прегледайте настройките на производителя на ултразвуковия апарат за употреба и работа (включително нивото на водата и типа на епруветката).</p> <p>Осигурете подходящо въвеждане на пробата в анализа.</p> <p>Вижте Изисквания за пробите на страница 27 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27.</p> <p>Може да се наложи екстракция на нова проба и/или повторение на стъпката на фрагментиране на gDNA, ако пробата е прекалено фрагментирана или повредена.</p>

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
	<p>Пробата може да е прекалено фрагментирана или да има увреждане на нуклеинова киселина, което влияе върху способността за генериране на достатъчно уникални библиотеки</p>	<p>Прегледайте настройките на производителя на ултразвуковия апарат за употреба и работа (включително нивото на водата и типа на епруветката).</p> <p>Осигурете подходящо въвеждане на пробата в анализа.</p> <p>Вижте Изисквания за пробите на страница 27 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27.</p> <p>Може да се наложи екстракция на нова проба и/или повторение на стъпката на фрагментиране на gDNA, ако пробата е прекалено фрагментирана или повредена.</p>
<p>RNA библиотеката не преминава спецификациите за контрол на качеството</p>	<p>Изискванията за въвеждане на проба не бяха изпълнени</p>	<p>Осигурете подходящо въвеждане на пробата и повторете приготвянето на библиотеката от стъпката Денатуриране и отгряване на RNA.</p> <p>Вижте Изисквания за пробите на страница 27 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27.</p>

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
	Грешка при използване или оборудване в работния процес на анализа	<p>Повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Секвенирайте повторно библиотеките от PCR плаката за нормализация на библиотеки (NL). Вижте Приготвяне за секвениране на страница 79. • Обогатете отново библиотеките от PCR плаката с проби на усиленни библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 61. • Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Денатуриране и отгряване на RNA на страница 47.
	Пробата може да е прекалено фрагментирана или да има увреждане на нуклеинова киселина, което влияе върху способността за генериране на достатъчно уникални библиотеки	<p>Осигурете подходящо въвеждане на пробата. Вижте Изисквания за пробите на страница 27 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 27.</p> <p>Може да се наложи екстракция на нова проба, ако пробата е прекалено фрагментирана или повредена.</p>

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
Неуспех на положителната контрола (DNA/RNA)	Изискванията за въвеждане на проба за положителната контрола не бяха изпълнени	Осигурете подходящо въвеждане в анализа. Прегледайте оформлението на плаката и се уверете, че подходящите реагенти (сонди, индекси) са в подходящите ямки. Уверете се, че положителната контролна проба се съхранява в съответствие с етикета. За всички проби, които споделят положителната контрола, повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване.
	Грешка при използване или оборудване в работния процес на анализа	<ul style="list-style-type: none"> Секвенирайте повторно библиотеките от PCR плаката за нормализация на библиотеки (NL). Вижте Приготвяне за секвениране на страница 79. Обогатете отново библиотеките от PCR плаката с проби на усилени библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 61. Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Денатуриране и отгряване на RNA на страница 47 или Фрагментиране на gDNA на страница 52.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
Неуспешна NTC (DNA/RNA)	<p>Възникнало е кръстосано замърсяване или замърсяване на работната зона</p> <hr/> <p>Неправилно индексирание на библиотеката</p>	<p>Прегледайте раздела Предупреждения и предпазни мерки за информация относно премахване на замърсяването на работните зони.</p> <p>Прегледайте „Предупреждения и предпазни мерки“ за информация относно избягването на кръстосано замърсяване.</p> <p>Прегледайте оформлението на плаката и индексиранието на библиотеката, за да се уверите, че библиотеки с един и същи индекс не са секвенирани заедно.</p> <p>Повторете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес за всички библиотеки, които споделят контрола без шаблон.</p>
Софтуерът показва, че положителните и/или отрицателните контроли не са били включени в изпълняване на секвенирането	Неправилно задаване на Тип тумор в планирането на изпълнение в Local Run Manager	Настройте повторно анализ с правилно идентифицирани контроли, както е указано в Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661).

Функционални характеристики

TSO Comprehensive (EU) е целеви NGS панел с 517 гена. Малки варианти на DNA – еднуклеотидни варианти (SNV), многонуклеотидни варианти (MNV), инсерции и делеции – са допустими за отчитане от всички 517 гена. Генните амплификации са допустими за отчитане от MET и ERBB2 гените. Сливанията са допустими за отчитане от 23-те гена, посочени в [TSO Comprehensive \(EU\) Генен панел за анализ на страница 2](#). Сплайс вариантите са допустими за отчитане от MET и EGFR гените. За да бъдат отчетени, вариантите трябва да бъдат открити и да са с доказателства в БЗ на анализа TSO Comprehensive (EU) и да бъдат допустими въз основа на тествания тип тъкан. За да бъдат отчетени, NTRK сливанията изискват партньорът за сливане да бъде 5' и NTRK или RET киназният домейн да бъде непокътнат.

За малките варианти на DNA е проведен представителен подход за валидиране на целевите гени в панела с данни, представляващи SNV, MNV, инсерции и делеции. За генни амплификации, сливания и сплайс варианти тестването е извършено на ниво ген. TMB и MSI са оценени, където са посочени. За исканията за CDx на NTRK, сливания в FFPE проби бяха тествани в проучвания, фокусирани върху характеристиките, специфични за искането (като граница на откриване, прецизност в рамките на лабораторията, възпроизводимост, точност и клинична производителност).

[Таблица 42](#) са дадени дефинициите на показателите, изчислени в различните проучвания.

Таблица 42 Дефиниции на показателите

Термин	Дефиниция
Положително процентно съответствие (PPA)	Процентът на правилно идентифицираните положителни резултати от общия брой положителни резултати, сравнен по ортогонален метод.
Отрицателно процентно съответствие (NPA)	Процентът на правилно идентифицираните отрицателни резултати от общия брой отрицателни резултати, сравнен по ортогонален метод.
Общо процентно съответствие (OPA)	Процентът на правилно идентифицираните положителни и отрицателни резултати от общия брой наблюдавани резултати, сравнен по ортогонален метод.
Положителна процентна съгласуваност (PPC)	Процентът на положителните обозначавания, правилно идентифицирани от общия брой положителни обозначавания, в сравнение с контролното състояние при пряко сравнение по двойки.

Термин	Дефиниция
Отрицателна процентна съгласуваност (NPC)	Процентът на правилно идентифицираните отрицателни обозначавания от общия брой отрицателни обозначавания в сравнение с контролното състояние при пряко сравнение по двойки.
Процент положително обозначаване (PPC)	Процент на наблюденията, които са положителни за дадена цел, сред наблюденията, които се очаква да бъдат положителни за целта.
Процент отрицателно обозначаване (NPC)	Процент на наблюденията, които са отрицателни за дадена цел, сред наблюденията, които се очаква да бъдат отрицателни за целта.

Кръстосано замърсяване

Проучването на кръстосано замърсяване беше проведено, за да се оцени дали се появяват фалшиво положителни резултати, дължащи се на замърсяване от ямка до ямка по време на приготвянето на библиотеката с проби, както и замърсяване между последователни изпълнявания на секвениране, за TSO Comprehensive (EU) анализа. Две DNA и две RNA проби с уникални не припокриващи се варианти бяха използвани за да се направи оценка за кръстосано замърсяване. Тридесет и две DNA библиотеки и 32 RNA библиотеки бяха подготвени по три пъти всяка от двама оператори в оформление на табло с редуващи се проби за оценка на замърсяването от ямка до ямка и с редуващи се индекси за оценка на замърсяване от изпълняване до изпълняване на секвениране, когато се секвенират последователно на същия Инструмент NextSeq 550Dx. За да се направи оценка за кръстосано замърсяване, се използват малки варианти на DNA (които също включват TMB) и RNA варианти (MSI и генна амплификация не са оценявани). Проучването на кръстосано замърсяване показва нулеви събития на замърсяване, наблюдавани при изследване на откритите варианти във всяка проба, без открити фалшиво положителни резултати.

Оценка на комплект за извличане на нуклеинова киселина

Бяха оценени три налични в търговската мрежа комплекта за извличане на DNA и RNA с TSO Comprehensive (EU). Трите комплекта за извличане изолираха както DNA, така и RNA от едни и същи FFPE тъканни срезове. Комплектите се различават по депарафинизиращото вещество и етапите на свързване на нуклеиновите киселини ([Таблица 43](#)). Комплект 1 беше преобладаващият комплект за извличане, използван за определяне на ефективността на TSO Comprehensive (EU).

Таблица 43 Характеристики на комплектите

Комплект	Депарафинизиращо вещество	Свързване на нуклеиновите киселини
1	Собствено	Колона
2	Ксилол	Колона
3	Минерално масло	Магнитни топчета

По седем проби (5 FFPE тъкани и 2 FFPE клетъчни линии) бяха извлечени в две копия от 2-ма оператори, с повтаряне в рамките на 3 дни за всеки от 3-те комплекта за извличане (7 проби x 3 комплекта за извличане x 2-ма оператора за извличане x 3 дни за извличане x 2 репликати за извличане).

Таблица 44 обобщава влиянието на комплектите за извличане върху валидността на библиотеката и обозначаването на варианти. Относно валидността на библиотеката е отчетена най-голямата разлика в процентите между комплектите за извличане, а значимостта е определена чрез количествен анализ на показателите на библиотеката. Относно обозначаването на варианти, ако средните стойности на комплектите за извличане се различават значително, разликата се отчита.

Наблюдава се, че комплектите за извличане влияят върху показателите за валидност на библиотеките за малки варианти на DNA/TMB и MSI. Показателите за валидност на библиотеките за генни амплификации и RNA не се различават съществено между различните комплекти за извличане. Комплектите за извличане не повлияха на обозначаването на малки варианти на DNA и на оценката на TMB. По отношение на оценката на MSI и генните амплификации не бяха открити фалшиво положителни резултати, а количественият анализ не установи значителни разлики при отрицателните проби. Наблюдава се, че комплектите за извличане имат различни стойности на поддържащите разчитания, поради което сливанията и сплайс вариантите в близост до LoD могат да бъдат пропуснати поради избора на комплект за извличане.

Избраният комплект за извличане трябва да се използва в лабораторията за проверка на работните характеристики на TSO Comprehensive (EU) и да дава задоволителна валидност на библиотеката.

Таблица 44 Въздействие на комплекта за извличане върху валидността на библиотеката и обозначаването на варианти

Тип вариант	Степен на валидност на библиотеката (Най-голяма разлика)	Обозначаване на вариант (Най-голямата средна разлика в подлежащата променлива)
Малки DNA варианти	Значително по-малка при комплект 2 в сравнение с комплект 3 (10%)	Незначителна
TMB		Незначителна
MSI	Значително по-малка при комплект 1 в сравнение с комплект 3 (14%)	Няма открити фалшиво положителни резултати Няма оценени фалшиво отрицателни резултати

Тип вариант	Степен на валидност на библиотеката (Най-голяма разлика)	Обозначаване на вариант (Най-голямата средна разлика в подлежащата променлива)
Генна амплификация	Незначително (5%)	Няма открити фалшиво положителни резултати Няма оценени фалшиво отрицателни резултати
Сливания	Незначително (3%)	Значително по-малко при комплект 1 в сравнение с комплект 3 (11%)
Сплайс варианти		Значително по-малко при комплект 1 в сравнение с комплект 3 (11%)

Смущаващи процеса вещества

Въздействието на потенциални ендогенни и екзогенни вещества върху ефективността на анализа TSO Comprehensive (EU) е оценено върху 16 уникални FFPE проби от мозък, щитовидна жлеза, дебело черво, гърда, бял дроб, простата, кожа и меки тъкани. По време на процеса на извличане на нуклеинови киселини в пробите са добавени ендогенни вещества – меланин и хемоглобин. По време на процеса на извличане на нуклеинова киселина са били налични и екзогенни вещества (етанол, ксилол и протеиназа К), които впоследствие са добавени към пречистената нуклеинова киселина преди приготвянето на библиотеката. Добавянето на допълнителна протеиназа К по време на процеса на извличане също е оценено, като при добавяне на протеиназа К се наблюдава смущение. Използвана е ендогенна контрола без примеси и екзогенна контрола с буфер или вода за всяка от 16-те уникални проби. Влиянието на некрозата е оценено върху различен набор от осем FFPE проби от тъкани на бял дроб, мозък и дебело черво. За всяка проба с некроза има и макродисектирана контрола без некроза. За всички интерференти са тествани четири репликати на проба за всяко вещество с анализа TSO Comprehensive (EU) и сравнени със съответната им контрола за откриване на малки варианти на DNA, генни амплификации, сливания на RNA и RNA сплайс варианти, както и за MSI статус и оценка на TMB.

Откриване на DNA вариант

Меланинът (0,2 µg/ml), хемоглобинът (2 mg/ml), етанолът (5%), протеиназата К (0,04 mg/ml) и ксилолът (0,0001%) не смушават оценката на TMB, MSI статуса, малките варианти на DNA и генните амплификации.

Откриване на RNA вариант

Данните потвърждават, че хемоглобинът (2 mg/ml), меланинът (0,2 µg/ml), етанолът (5%) и ксилолът (0,0001%) не смушават сливанията на RNA или сплайс вариантите. По подобен начин не е наблюдавано смущение на откриването на варианти на RNA при добавяне на 0,02 mg/ml от протеиназа К към RNA преди събитието по приготвяне на библиотеката и при добавяне на до 2,6 mg/ml от протеиназа К към пробата по време на процеса на пречистване на RNA.

Наблюдавани са някои фалшиво положителни резултати спрямо контролите без интерференти между репликираните библиотеки за сливания на RNA с хемоглобин, меланин, етанол и ксилол, както и за RNA сплайс варианти с меланин и ксилол. По подобен начин са наблюдавани някои фалшиво отрицателни резултати при някои репликирани библиотеки за RNA сплайс варианти с хемоглобин, меланин, ксилол и 0,02 mg/ml протеиназа К. Във всички случаи обаче се счита, че фалшиво положителните и фалшиво отрицателните резултати се дължат на проблеми с пробите, тъй като наблюденията за откритите събития показват поддържащи разчитания в близост до LoD. Затова фалшиво положителните и фалшиво отрицателните резултати в различните репликати се считат за несвързани със смущения и се дължат на случайни вариации на броя на поддържащите разчитания за сливания и/или сплайс варианти на или под LoD.

Некроза

Наличието на некротична тъкан до 70% не смущава оценката на TMB, MSI статуса, малките варианти на DNA или RNA сплайс вариантите. Откриването на сливания на RNA и генни амплификации е затруднено при проби с $\geq 25\%$ некротично съдържание в областта на тъканта. Ако участъкът от пробата съдържа повече от 25% некроза в общата площ на тъканта, тогава некротичната тъкан трябва да бъде макродисектирана.

Стабилност

Стабилност в реално време

Стабилността в реално време е използвана, за да се установи срокът на годност на комплекта за анализ TSO Comprehensive (EU), когато се съхранява според условията на етикета. Дизайнът на проучването се основава на тестването на 3 партиди реагенти и използва класическия дизайн на проучването за стабилност, описан в CLSI EP25-A. Комплектите се съхраняват в окончателна конфигурация на комплект за периода на проучването, при условия на съхранение, определени на етикета на продукта. Замразените компоненти на комплекта се съхраняват при -15°C до -25°C . Охладените компоненти на комплекта се съхраняват при 2°C до 8°C . Компонентите на стайна температура се съхраняват при 15°C до 30°C .

Комплектите са тествани за външен вид и функционални критерии за освобождаване на комплектите в определени времеви точки. Също така за контролния материал за КК са анализирани тенденциите на показателите за обозначаване на варианти и КК на проби. Срокът на годност е определен за всеки реагент. Датите на изтичане на срока на годност са определени въз основа на датата на производство и срока на съхранение. Срокът на годност на комплекта се определя въз основа на реагента с най-ранно изтичащ срок на годност.

Стабилност на комплекта при употреба

Стабилността при употреба на комплекта за анализ TSO Comprehensive (EU) е оценена при стандартни условия на употреба в рамките на срока на годност, за да се поддържа многократно употреба на комплекта. Комплектът с реагенти е подложен на многократно замразяване/размразяване и е тестван,

за да издържа до 4 употреби на комплекта. Освен това са приготвени 8 RNA и 8 DNA библиотеки общо 3 пъти, за да се тества максималният брой поддържани библиотеки (24 DNA и 24 RNA библиотеки на комплект). Всички функционални критерии за освобождаване на комплекта са изпълнени за всички тествани цикли на замразяване/размразяване и времеви точки. Извършено е тестване на FFPE проби с реагенти от ≥ 25 месеца, за да се оцени въздействието на тестването в процеса на употреба върху обозначаването на варианти. Качественият анализ на целевите варианти показва, че събитията в процеса на употреба не са повлияли на обозначаването на варианти.

Стабилност на библиотека

Стабилността на библиотеките, подготвени с анализа TSO Comprehensive (EU), е оценена с помощта на 8 FFPE DNA и 8 FFPE RNA проби от 9 различни типа тъкани, тествани в три копия чрез анализа.

Библиотеките от PCR плаката с нормализирана библиотека (NL) са обединени и секвенирани в ден 0. Останалият обем от библиотеките от PCR плаката в NL се съхранява замразен (-25°C до -15°C), след това се обединява наново и се секвенира в ден 30. Всички статистически значими резултати за малки варианти на DNA между ден 0 и ден 30 са технически незначителни. Няма статистически разлики между резултатите от ден 0 и ден 30 по отношение на MSI статус, оценка на TMB, генни амплификации, RNA сливания и RNA сплайс варианти. Данните показват, че библиотеките, генерирани от анализа TSO Comprehensive (EU), са стабилни до 30 дни при -25°C до -15°C .

Стабилност на FFPE тъкани върху предметно стъкло

Стабилността на FFPE тъканите върху предметно стъкло за употреба с анализа TSO Comprehensive (EU) е оценена чрез разрязване на FFPE блокове (5 μm сегменти) от 16 уникални проби, представляващи 9 вида тъкани върху предметни стъкла, последвано от съхраняване при стайна температура в 3 времеви точки: 1 ден (контрола), 4 седмици и 8 седмици. Нуклеиновите киселини (както DNA, така и RNA) се извличат в посочената времева точка, след което се съхраняват в замразено състояние до приключване на извличането във всички времеви точки. Екстрахираната RNA се съхранява при -65°C до -85°C , а екстрахираната DNA се съхранява при -25°C до -15°C . За всяка времева точка са тествани три репликати на проба с анализа TSO Comprehensive (EU) и сравнени с контролата за малки варианти на DNA, MSI статус, оценка на TMB, генни амплификации, RNA сливания и сплайс варианти на RNA. Данните показват, че FFPE тъканите върху предметно стъкло за употреба с анализа TSO Comprehensive (EU) са стабилни до 4 седмици.

Защитна лента при входящо титруване на нуклеинови киселини

Входящите нуклеинови киселини за анализа TSO Comprehensive (EU) са оценени чрез тестване на DNA от 33 FFPE проби, обхващащи 17 вида тъкани, при входящи нива в диапазона от 10 ng до 500 ng, и тестване на RNA от 5 FFPE проби от 5 типа тъкани при входящи нива в диапазона от 10 ng до 85 ng. Бяха оценени показателите за КК на библиотеките и бяха зависими от пробите. Резултатите за DNA показват, че някои, но не всички показатели за КК на DNA пробите реагират на увеличени входни данни над номиналните

стойности от 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE не реагира на входни данни над 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE показва положителна корелация с увеличаването на входните данни.
- PCT_EXON_50X се увеличава с нарастване на входните данни до 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES се увеличава с нарастване на входните данни. Някои проби с по-малко от 40 USABLE_MSI_SITES при 40 ng отговарят на спецификацията при по-високи входни данни, което позволява да се изчисли оценка на MSI.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET се увеличава с нарастване на входните данни.
- Нарастването на входните данни увеличава COVERAGE_MAD към горната граница на спецификация.

Показателите за КК на RNA пробите се увеличават (MEDIAN_INSERT_SIZE и TOTAL_ON_TARGET_READS) или намаляват (MEDIAN_CV_GENE_500X) от 10 ng до 40 ng, но като цяло не се променят между 40 ng и 85 ng за входни данни.

Граница на празна проба

Процентът на фалшиво положителните резултати (от общия брой очаквани отрицателни резултати) е оценен чрез репликатно тестване на FFPE нормална или доброкачествена съседна тъкан, която не трябва да съдържа соматични варианти за малки варианти на DNA, генни амплификации, MSI, сливания на RNA и RNA сплайс варианти. Фалшиво положителните резултати не са анализирани за TMB, тъй като няма клинична граница. Шест DNA и 6 RNA FFPE проби бяха пуснати в два екземпляра с 2 оператора в продължение на 3 дни за всяка от 2-те партии реагенти. Подгрупа от проби беше повторно обединена и повторно секвенирана само в 3x DNA и само в 3x RNA формат за оценка на фалшиво положителни резултати с няколко мултиплексни конфигурации, поддържани от това устройство. Освен това имаше 30 допълнителни проби от RNA, извършени в два екземпляра, които бяха обработени с 1 партида реагент, разделена между 2 оператора. Общо имаше 168 възможни наблюдения за DNA и 228 наблюдения за RNA, намалени от невалидни библиотеки за всеки тип вариант. Процентът на фалшиво положителните резултати е изчислен на генно ниво за амплификации и на ниво позиция (приблизително 1,9 милиона позиции) за малки варианти на DNA. Процентът на фалшиво положителните резултати за типовете варианти на DNA е показан в [Таблица 45](#). Процентът фалшиво положителните за RNA сливане и сплайс варианти е 0%, както е показано в [Таблица 46](#).

Таблица 45 Фалшиво положителни според тип вариант на DNA

Тип вариант	Фалшиво положителни резултати
Генни амплификации	0% (0/9912)
Малки DNA варианти	0,0001% (271/295 801 567)
MSI	0% (0/156)
TMB	Не е приложимо*

* Фалшиво положителните не са приложими, тъй като TMB се отчита като резултат и няма качествен резултат.

Таблица 46 Фалшиво положителни според тип вариант на RNA

Тип вариант	Фалшиво положителни резултати
Сливане	0% (0/226)
Сплайс вариант	0% (0/226)

Граница на откриване

Бяха проведени две проучвания за оценка на границите на откриване за TSO Comprehensive (EU). Проучване 1 оцени малки варианти на DNA на RET, RET сливания и NTRK1 – 3 сливания. Проучване 2 оцени други варианти на профилиране на тумор.

Проучване 1

Бяха определени границите на откриване (LoD) на NTRK1, NTRK3 и RET малки варианти на DNA и NTRK1 – 3 и RET сливания. LoD е най-ниската стойност на анализа (например честота на вариант на алел или поддържащи разчитания), която може да бъде открита последователно (95% граница на откриване или грешка тип II от 5%). FFPE тъкани с RET малки варианти на DNA (медуларен рак на щитовидната жлеза), RET сливания (папиларен рак на щитовидната жлеза, атипичен шпиц тумор) и NTRK1 – 3 сливания (нискостепенен глиом, глиобластом мултиформен, миофибробластен сарком, сарком, секреторен карцином на гърдата, рак на дебелото черво), както и третирана с FFPE клетъчна линия с малки варианти на NTRK1 и NTRK3 на DNA бяха използвани в проучването. Всяка проба беше разреждана до най-малко 5 тестови нива (вариращи между приблизително 0,01 – 0,10 за малки варианти на DNA и 2 – 25 поддържащи разчитания за сливания). Имаше 18 наблюдения за всяко тестово ниво на партида на вариант, проведени от 3-ма оператори и 3 секвениращи инструмента, инициращи приготвяне на библиотеки в 3 непоследователни дни с 2 реплики на всяка проба от тестово ниво. Бяха тествани две партиди реагенти.

За варианти на DNA двете партиди бяха анализирани независимо с помощта на пробит регресия или подход за скорост на попадане (най-ниско ниво на тест с честота на попадане (оценка на точки) $\geq 95\%$), за да се определи LoD за всеки вариант по партида. По-голямата LoD в двете партиди реагенти беше приета като граница на откриване за варианта (Таблица 47).

За сливания на RNA бяха използвани FFPE клетъчни линии за оценка на стойностите на LoD за всеки слят ген. След това LoDs бяха проверени с FFPE тъкани, като се използваха дублирани библиотечни препарати за 3 оператора, 3 инструмента и 3 партиди реагенти, за да се генерират 54 наблюдения на вариант в близост до LoD, установена с FFPE клетъчни линии. Заявените граници на откриване за всяко сливане (Таблица 48) са най-ниските средни поддържащи разчитания, които са достигнали честота на попадане (точкова оценка) $\geq 95\%$.

Таблица 47 Граница на откриване за малки варианти на DNA NTRK1, NTRK3 и RET

Маркер	Chr	Позиция	Референция	Алтернатива	Граница на откриване (Вариантна алелна честота)
NTRK1 G595R (SNV)*	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV)*	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV)*	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV)*	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 (делеция)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

Chr = Хромозома

* Тези варианти на DNA бяха анализирани чрез пробит регресия; другите варианти на DNA бяха анализирани чрез подхода за скорост на попадане.

Таблица 48 Граница на откриване за NTRK и RET сливания

Ген	Сливане	Граница на откриване (Поддържащи разчитания)
NTRK1	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6

Проучване 2

Оценени са границите на откриване (LoD) на вариантите на профилиране на тумор, отчетени от TSO Comprehensive (EU). LoD е най-ниската стойност на анализа (честота на вариантите алели, промяна в пъти или поддържащи разчитания), която може да бъде открита последователно (95% честота на попаденията или 5% грешка от тип II). FFPE проби от 17 вида тъкани, съдържащи варианти, бяха разредени до много тестови нива. Двама оператори, всеки от които използва различна партида с реагенти и инструмент, извършиха по шест наблюдения за всяко ниво.

DNA варианти

LoDs на 10 класа малки варианти на DNA (общо 25 варианта) и 2 амплификации на DNA ген (ERBB2 и MET) бяха определени и обобщени като диапазони ([Таблица 49](#)). Включени са и варианти на RET от LoD за Проучване 1. Две от 3 инсерции, по-големи от 5 bp, имаха LoD от 0,034 и 0,036 VAF, като третата имаше LoD от 0,215 VAF. Последната беше инсерция в регион с ниска сложност, където инсерцията добавя допълнителни повторения, въздейства на подравняването и изисква повече разчитания за последователно откриване. Следователно, някои геномни контексти с ниска сложност могат да повлияят на откриването на инсерции > 5 bp.

Таблица 49 Граница на откриване за малки варианти на DNA и генни амплификации

Тип (мерна единица за LoD)	Вариант клас/геномен контекст	Брой варианти	Обхват
Малки DNA варианти (алелна честота на вариант)	SNV	5	0,016 – 0,064
	MNV	3	0,022 – 0,048
	Инсерция (1-2 bp) близо до хомополимерни повторения	2	0,086 – 0,104
	Инсерция (1-2 bp) близо до динуклеотидни повторения	2	0,038 – 0,051
	Инсерция (3-5 bp)	2	0,030 – 0,056
	Инсерция (> 5 bp и до 25 bp)	3	0,034 – 0,215
	Делеция (1-2 bp) близо до хомополимерни повторения	2	0,094 – 0,100
	Делеция (1-2 bp) близо до динуклеотидни повторения	2	0,033 – 0,070
	Делеция (3-5 bp)	2	0,028 – 0,064
	Делеция (> 5 и до 25 bp)	2	0,047 – 0,055
Генна амплификация (промяна в съгването)	По ген (ERBB2, MET)	2	2,034 – 2,195

Сливания

LoDs бяха определени за 18 сливания, което представлява 20 гена в TSO Comprehensive (EU) панела, които варираха от 10 до 54,7 поддържащи разчитания (Таблица 50). Допълнителни 3 гена (NTRK1 – 3) бяха тествани в друго проучване. Генът RET беше тестван тук и в другото проучване на LoD.

Шестнадесет сливания с определени LoD имаха данни, съответстващи на обща LoD от 16 поддържащи разчитания, използвайки двустранна, 95% горна граница на доверие (UCL). Две сливания имаха LoD от 24,7 и 44,2 поддържащи разчитания, които не бяха в съответствие с общата LoD.

Сливането FGFR2-SRPK2 със стойност на LoD от 24,7 поддържащи разчитания имаше повтарящи се припокриващи се региони в точката на прекъсване, както е посочено от софтуера за анализ TSO Comprehensive (EU). Повтарящите се региони в рамките на точка на прекъсване обикновено имат пониски нива на доказателства, тъй като разчитанията могат да се картографират другаде в генома или могат да останат неподравнени. Освен това повтарящите се региони правят процеса на сглобяване

(използван за идентифициране на фузионни секвенции) по-предизвикателен и изискват допълнителни доказателства за конструиране на правилната секвенция. SEPT14-EGFR е друг пример за сливане с хомоложна секвенция в точката на прекъсване.

Сливането BCL2-IGHJ5 със стойност на LoD от 44,2 поддържащи разчитания имаше много къс ген (IGHJ5) с точката на прекъсване близо до началото на екзон, изискващ къси подравнявания с пропуски. Следователно, бяха необходими още разчитания за последователно откриване.

Таблица 50 Граница на откриване за сливания

Сливане	Ген А точка на прекъсване	Ген Б точка на прекъсване	LoD	Обща LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	10,0	да
TMPRSS2-ERG	39817543	42880007	13,2	да
KIF5B-RET	32311775	43612032	14,5	да
ACPP-ETV1	132036419	14028762	17,2	да
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	да
EML4-ALK	29446394	42553391	20,2	да
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	да
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	24	да
ESR1-CCDC170	151857451	152023138	24,3	да
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	не
HNRNPUL1-AXL	41743847	41782201	26,3	да
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	28,2	да
SPIDR-NRG1	32453345	48353103	28,2	да
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	28,5	да
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	30,5	да
MKRN1-BRAF	140487383	140158806	31,2	да
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	44,2	не
PAX3-FOXO1	41134997	223084859	54,7	да

Сплайс варианти

2-та RNA сплайс варианта – MET и EGFR – имат поддържащи разчитания за LoD съответно 18,7 и 24,8.

Туморно съдържание

Резултатите в проучването се използват за изготвяне на препоръки за туморно съдържание в клинични проби. В общия случай колкото по-голямо е туморното съдържание, толкова по-висок е „сигналят“ (VAF, промяна в пъти или поддържащи разчитания) за варианти в тумора. Препоръките за минимално туморно

съдържание се основават на следните наблюдения. Стойностите на LoD за малките варианти на DNA не надвишават 0,104 VAF (с изключение на инсерцията в TP53). За откриване на подхранващи мутации в тумора (с честота на вариантите алели 0,50) се препоръчва 20% туморно съдържание, така че тези мутации да имат 0,10 VAF и да са на или над LoD. При 20% туморно съдържание гените, амплифицирани до промяна от 5,5 пъти (11 копия), ще бъдат последователно открити въз основа на граница на откриване с промяна от 1,8 пъти. При 20% туморно съдържание сливанията с 80 поддържащи разчитания ще бъдат последователно открити въз основа на граница на откриване от 16 поддържащи разчитания.

Възпроизводимост

Проведени са две проучвания за оценка на възпроизводимостта за анализа TSO Comprehensive (EU). Проучване 1 оценява RET малки варианти на DNA в допълнение на варианти с NTRK и RET сливания. Проучване 2 оценява допълнителни варианти за профилиране на тумори.

Проучване 1

Това проучване е проведено за оценка на възпроизводимостта на анализа TSO Comprehensive (EU) в 3 центъра за тестване (1 вътрешен, 2 външни) с по 2 оператора на всеки център, 2 повторения в рамките на процедурата и 3 непоследователни дни за тестване. Тестването е проведено с панел за възпроизводимост, включително проби от DNA, съдържащи специфични известни RET малки варианти на DNA и проби от RNA, съдържащи специфични известни варианти на NTRK1 – 3 и RET сливане от фиксирани с формалин, включени в парафин (FFPE) тъканни проби и клетъчни линии. Панелът съдържа DNA и RNA членове на панела с ниски нива на варианти и високи нива на варианти с един и същ брой членове на панела с ниско и с високо ниво за всеки вариантен клас. Членовете на панела с високо ниво са целеви при приблизително 2 до 3 пъти стойността на LoD, а членовете на панела с ниско ниво са целеви при стойност около LoD. На всяко място всеки оператор тества членовете на панела в две повторения по 3 пъти, като генерира 6 наблюдения на цел на всеки член на панела. От всичките 3 центъра бяха генерирани 36 наблюдения на член на панела (3 центъра/инструмента × 2 оператора × 2 повторения в рамките на изпълняване × 3 начални дни).

Процентът положителни обозначавания (PPC) и процентът отрицателни обозначавания (PNC) за целеви малки варианти на DNA и целеви варианти на RNA сливане на високо ниво бяха определени като първични крайни точки. PPC и PNC за целеви малки варианти на DNA и целеви варианти на сливане на RNA на ниско ниво бяха изчислени като вторични крайни точки. Двустранните 95% доверителни интервали (CI), свързани с всички крайни точки, са изчислени по метода за оценка на Уилсън.

Първичните анализи са извършени, за да се оценят PPC и PNC (със съответните 95% CI) при целевите членове на панела на високо ниво чрез комбиниране на наблюденията на анализа TSO Comprehensive (EU) за дадена цел в група от членове на панела, представляващи приложимия клас варианти (например малки варианти на DNA и RNA сливания) с различни обекти/инструменти, оператори и процедури. За всеки целеви вариант наблюденията от анализа TSO Comprehensive (EU) при други членове на панела на високо ниво, насочени към същия тип вариант, но несъдържащ същия вариант, както е определено от правилото за мнозинство, бяха комбинирани към изчисления PNC. Общите PPC и PNC за целевите членове на панели на ниско ниво бяха определени по подобен начин.

RET малки варианти на DNA

За членовете на панела с малки варианти на DNA на високо ниво, общата PPC е 100,0% (207/207; 95% CI: 98,2% до 100,0%) (Таблица 51). За членовете на панела с малки варианти на DNA на високо ниво, общият PNC е 100,0% (1035/1035; 95% CI: 99,6% до 100,0%) (Таблица 52). За целеви членове на панела с малки варианти на DNA на ниско ниво, общата PPC за целевите членове на панела с малки варианти на DNA на ниско ниво е 99,1% (210/212; 95% CI: 96,6% до 99,7%), а общият PNC е 100,0% (1026/1026; 95% CI: 99,6% до 100,0%).

Таблица 51 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на RET малки варианти на DNA в целеви членове на панела от високо и ниско ниво

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотиден)	Целеви вариант (аминокиселинен)	n	Средна стойност на VAF	Процент положителни обозначавания (%)	95% CI*
Високо	SNV	chr10_43617416_ T_C	RET M918T	34	0,156	100,0% (34/34)	(89,8%, 100,0%)
Високо	SNV	chr10_43609949_ G_C	RET C634S	36	0,140	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Високо	SNV	chr10_43614996_ G_A	RET V804M	33	0,116	100,0% (33/33)	(89,6%, 100,0%)
Високо	MNV	chr10_43609949_ GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Високо	Делеция	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0% (33/33)	(89,6%, 100,0%)
Високо	Инсерция	chr10_43609946_ T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Високо	Високо ниво на всички малки варианти на DNA	Високо ниво на всички малки варианти на DNA	Високо ниво на всички малки варианти на DNA	207	Не е приложимо	100,0% (207/207)	(98,2%, 100,0%)

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотиден)	Целеви вариант (аминокиселинен)	n	Средна стойност на VAF	Процент положителни обозначавания (%)	95% CI*
Ниско	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Ниско	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3% (33/35)	(81,4%, 98,4%)
Ниско	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Ниско	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Ниско	Делеция	chr10_43615611 GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0% (34/34)	(89,8%, 100,0%)
Ниско	Инсерция	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Ниско	Ниско ниво на всички малки варианти на DNA	Ниско ниво на всички малки варианти на DNA	Ниско ниво на всички малки варианти на DNA	212	Не е приложимо	99,1% (210/212)	(96,6%, 99,7%)

Съкращения: N/A, неприложимо; VAF, честота на вариант на алела.

* Двустранният 95% доверителен интервал, изчислен по метода за оценка на Wilson.

Таблица 52 PNC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на RET малки варианти на DNA в целеви членове на панела от високо и ниско ниво

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотиден)	Целеви вариант (аминокиселинен)	n ¹	Процент отрицателни означавания (%)	95% CI ²
Високо	SNV	chr10_43617416_ T_C	RET M918T	173	100,0% (173/173)	(97,8%, 100,0%)
Високо	SNV	chr10_43609949_ G_C	RET C634S	171	100,0% (171/171)	(97,8%, 100,0%)
Високо	SNV	chr10_43614996_ G_A	RET V804M	174	100,0% (174/174)	(97,8%, 100,0%)
Високо	MNV	chr10_43609949_ GC_AT	RET C634Y	172	100,0% (172/172)	(97,8%, 100,0%)
Високо	Делеция	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0% (174/174)	(97,8%, 100,0%)
Високо	Инсерция	chr10_43609946_ T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0% (171/171)	(97,8%, 100,0%)
Високо	Високо ниво на всички малки варианти на DNA	Високо ниво на всички малки варианти на DNA	Високо ниво на всички малки варианти на DNA	1035	100,0% (1035/1035)	(99,6%, 100,0%)
Ниско	SNV	chr10_43617416_ T_C	RET M918T	177	100,0% (177/177)	(97,9%, 100,0%)
Ниско	SNV	chr10_43601830_ G_A	RET V292M	143	100,0% (143/143)	(97,4%, 100,0%)
Ниско	SNV	chr10_43613840_ G_C	RET E768D	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Ниско	MNV	chr10_43609949_ GC_AT	RET C634Y	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотиден)	Целеви вариант (аминокиселинен)	n ¹	Процент отрицателни обозначавания (%)	95% CI ²
Ниско	Делеция	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0% (178/178)	(97,9%, 100,0%)
Ниско	Инсерция	chr10_43609946_ T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Ниско	Ниско ниво на всички малки варианти на DNA	Ниско ниво на всички малки варианти на DNA	Ниско ниво на всички малки варианти на DNA	1026	100,0% (1026/1026)	(99,6%, 100,0%)

¹ Всички наблюдения, обединени от комбинации между член на панел и вариант, за които повечето обозначавания са отрицателни, т.е. целеви варианти, съдържащи сливания, с по-малко от 50% положителни обозначавания.

² Двустранният 95%, доверителен интервал, изчислен по метода за оценка на Wilson.

Таблица 53 показва анализа на компонентите на дисперсията на честотите на вариантите на алелите (VAF) в приблизително 36 наблюдения за всеки член на панела. Стандартното отклонение (SD) и процентният коефициент на вариация (% CV; общо и за всеки източник) бяха изчислени и представени за всеки целеви RET малък вариант на DNA.

Таблица 53 Анализ TSO Comprehensive (EU) на компонентите на дисперсия чрез анализ на VAF при целеви членове на панела за малки варианти на DNA

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотиден)	Целеви вариан (аминокиселинен)	n	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на ден	SD (%CV) на репликат	Общо SD (%CV)
Високо	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%)
Високо	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%)
Високо	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%)
Високо	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%)
Високо	Делеция	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%)
Високо	Инсерция	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%)
Ниско	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%)
Ниско	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%)
Ниско	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%)

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотиден)	Целеви вариан (аминокиселинен)	n	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на ден	SD (%CV) на репликат	Общо SD (%CV)
Ниско	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%)
Ниско	Делеция	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	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%)
Ниско	Инсерция	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%)

NTRK 1 – 3 и RET сливания

За членовете на панела със сливане на RNA на високо ниво общата PPC е 99,3% (285/287; 95% CI: 97,5% до 99,8%) (Таблица 54). PPC е 100% за всеки член на панела на високо ниво, с изключение на члена на панела BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; 95% CI: 81,9% до 98,5%]). Общият PNC за членовете на панела за сливане на RNA на високо ниво е 100,0% (1724/1724; 95% CI: 99,8% до 100,0%) (Таблица 55). За целевите членове на панела за сливане на RNA на ниско ниво общата PPC е 95,4% (272/285; 95% CI: 92,3%, 97,3%), а общият PNC е 100,0% (1851/1851; 95% CI: 99,8% до 100,0%).

Таблица 54 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на NTRK и RET сливания при целеви членове на панел на високо и ниско ниво

Ниво на вариант	Целево сливане	n	Средна стойност на поддържащи разчитания	Процент положителни обозначавания (%)	95% CI*
Високо	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Високо	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4% (34/36)	(81,9%, 98,5%)
Високо	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Високо	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Високо	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Високо	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Високо	NCOA4-RET	36	36,7	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Високо	CCDC6-RET	36	33,4	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Високо	Най-висока стойност на сливанията	287	36,5	99,3% (285/287)	(97,5%, 99,8%)
Ниско	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4% (34/36)	(81,9%, 98,5%)
Ниско	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6% (29/36)	(65,0%, 90,2%)
Ниско	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3% (33/35)	(81,4%, 98,4%)

Ниво на вариант	Целево сливане	n	Средна стойност на поддържащи разчитания	Процент положителни обозначавания (%)	95% CI*
Ниско	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Ниско	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Ниско	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Ниско	NCOA4-RET	36	15,8	97,2% (35/36)	(85,8%, 99,5%)
Ниско	KIF5B-RET	34	16,6	97,1% (33/34)	(85,1%, 99,5%)
Ниско	Най-ниска стойност на сливанията	285	16,8	95,4% (272/285)	(92,3%, 97,3%)

* Двустранният доверителен интервал (CI) от 95%, изчислен по метода за оценка на Уилсън.

Таблица 55 PNC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на NTRK и RET сливания при нецелелеви членове на панел на високо и ниско ниво

Ниво на вариант	Целеви сливания	n ¹	Процент отрицателни обозначавания (%)	95% CI ²
Високо	LMNA-NTRK1	180	100,0% (180/180)	(97,9%, 100,0%)
Високо	BCAN-NTRK1	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Високо	ETV6-NTRK2	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Високо	TRIM24-NTRK2	216	100,0% (216/216)	(98,2%, 100,0%)
Високо	ETV6-NTRK3	144	100,0% (144/144)	(97,4%, 100,0%)
Високо	BTBD1-NTRK3	216	100,0% (216/216)	(98,2%, 100,0%)
Високо	NCOA4-RET	215	100,0% (215/215)	(98,2%, 100,0%)
Високо	CCDC6-RET	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)

Ниво на вариант	Целеви сливания	n ¹	Процент отрицателни обозначавания (%)	95% CI ²
Високо	Най-висока стойност на сливанията	1724	100,0% (1724/1724)	(99,8%, 100,0%)
Ниско	LMNA-NTRK1	213	100,0% (213/213)	(98,2%, 100,0%)
Ниско	BCAN-NTRK1	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Ниско	ETV6-NTRK2	250	100,0% (250/250)	(98,5%, 100,0%)
Ниско	STRN-NTRK2	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Ниско	ETV6-NTRK3	177	100,0% (177/177)	(97,9%, 100,0%)
Ниско	BTBD1-NTRK3	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Ниско	NCOA4-RET	213	100,0% (213/213)	(98,2%, 100,0%)
Ниско	KIF5B-RET	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Ниско	Най-ниска стойност на сливанията	1851	100,0% (1851/1851)	(99,8%, 100,0%)

¹ Всички наблюдения, обединени от комбинации между член на панел и вариант, за които повечето обозначавания са отрицателни, т.е. целеви варианти, съдържащи сливания, с по-малко от 50% положителни обозначавания.

² Двустранният доверителен интервал (CI) от 95%, изчислен по метода за оценка на Уилсън.

Таблица 56 е показан анализът на компонентите на дисперсията на поддържащите разчитания в приблизително 36 наблюдения в рамките на всяко целево сливане. SD и %CV (общо и за всеки източник) са изчислени и представени за всяко целево сливане.

Таблица 56 Анализ TSO Comprehensive (EU) на компонентите на дисперсия чрез анализ на поддържащите разчитания в целевите членове на панел за сливане на RNA

Ниво на вариант	Сливане	n	Средна стойност на поддържащи разчитания	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на ден	SD (%CV) на репликат	Общо SD (%CV)
Високо	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9%)	3,37 (9%)	6,93 (18%)	9,04 (24%)	12,39 (33%)

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

%CV: Процентен коефициент на вариация.

SD: Стандартно отклонение.

Проучване 2

Проведено е второ проучване за оценка на възпроизводимостта на анализа TSO Comprehensive (EU) в 3 обекта за тестване (2 външни и 1 вътрешен), 2 оператора/инструмента на място, 3 уникални партиди реагенти, 4 дни за тестване (непоследователни) и 2 изпълнявания на секвениране на библиотека от проби.

Тестването е извършено с извлечени DNA и RNA проби от 41 FFPE тъканни проби и 1 FFPE клетъчна линия (като 1 FFPE тъканна проба и FFPE клетъчната линия са използвани за създаване на по 2 члена на панел). Тъканните проби се състоят от следните видове: от пикочен мехур, кост, мозък, гърда, дебело черво, йеюнум, бъбрек, черен дроб, бял дроб, яйчник, простата, кожа, меки тъкани, стомах, щитовидна жлеза и матка. Тествани са общо 44 членове на панела, включително членове на DNA панела с малки варианти на DNA (SNV, MNV, инсерции и делеции), генни амплификации, различни оценки на TMB, високи оценки на MSI и членове на RNA панела с генни сливания и сплайс варианти. Повечето членове на панела притежават известни целеви варианти на нива, приблизително 2 до 3 пъти по-високи от специфичната за варианта граница на откриване ($\sim 2-3 \times \text{LoD}$).

LOD е концентрацията на анализа, при която наблюдаваните резултати от анализа са „положителни“ (открит вариант спрямо граничната стойност на анализа TSO Comprehensive (EU)) $\geq 95\%$ от времето. Средните наблюдавани нива на вариантите са категоризирани като приблизително $< 2 \times \text{LoD}$ (наблюдавани нива на вариантите при $< 1,5 \times \text{LoD}$) $\sim 2-3 \times \text{LoD}$ (наблюдавани нива на вариантите при $1,5 \times \text{LoD}$ до $3,4 \times \text{LoD}$) и приблизително $> 3 \times \text{LoD}$ (наблюдавани нива на вариантите при $> 3,4 \times \text{LoD}$).

Процентът положителни обозначавания (PPC) за малки варианти на DNA, генни амплификации, с висок MSI (MSI-H) и RNA варианти е изчислен чрез комбиниране на наблюденията за всички изпълнявания на секвениране и обекти. Процентът отрицателни обозначавания (PNC) е изчислен по подобен начин за малки варианти на DNA, генни амплификации и RNA варианти. За всеки известен целеви вариант наблюденията на анализа TSO Comprehensive (EU) при членове на панела от същия тип вариант, но съдържащи други варианти, които не са получени от същия източник на проби, нито отговарят на правилото за мнозинство за този вариант (т.е. $< 50\%$ от обозначаванията да са положителни), са комбинирани по обекти, оператори/инструменти, дни, партиди с реагенти и изпълнявания на секвениране, за да се изчисли PNC. Двустранните доверителни интервали (CI) от 95% са изчислени по метода за оценка на Уилсън.

Малки DNA варианти

[Таблица 57](#) показва PPC за целевите малки варианти на DNA. PPC варират от 91,3% за BRAF SNV до 100% за повечето малки варианти на DNA.

Таблица 57 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на малки варианти на DNA при целеви членове на комбиниран панел

Наблюдавано ниво на вариант ¹	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотид)	Целеви вариант (аминокиселина)	Средна VAF ²	Процент на положителни обозначавания (%)	95% CI ³
~2-3xLOD	ДЕЛЕЦИЯ	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0% (28/28)	(87,9%, 100,0%)
~2-3xLOD	ДЕЛЕЦИЯ	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0% (40/40)	(91,2%, 100,0%)
~2-3xLOD	ИНСЕРЦИЯ	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0% (32/32)	(89,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	ИНСЕРЦИЯ	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	ИНСЕРЦИЯ	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0% (4/4)	(51,0%, 100,0%)
~2-3xLOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3% (42/46)	(79,7%, 96,6%)
~2-3xLOD	ДЕЛЕЦИЯ	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0% (38/38)	(90,8%, 100,0%)
~2-3xLOD	ДЕЛЕЦИЯ	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0% (44/44)	(92,0%, 100,0%)
~2-3xLOD	ИНСЕРЦИЯ	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
~2-3xLOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
~2-3xLOD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0% (38/38)	(90,8%, 100,0%)
~2-3xLOD	ИНСЕРЦИЯ	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	ДЕЛЕЦИЯ	chr10_89720798_ GТАCT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0% (44/44)	(92,0%, 100,0%)
<2xLOD	ИНСЕРЦИЯ	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0% (2/2)	(34,2%, 100,0%)

Наблюдавано ниво на вариант ¹	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотид)	Целеви вариант (аминокиселина)	Средна VAF ²	Процент на положителни обозначавания (%)	95% CI ³
~2-3xLOD	ИНСЕРЦИЯ	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)

¹ Ниво на вариант, изчислено въз основа на средната наблюдавана честота на вариантните алели.

² Средна честота на вариантните алели, изчислена въз основа на наблюдаваните резултати от анализа.

³ Двустранният доверителен интервал от 95%, изчислен по метода за оценка на Уилсън.

PNC е 100% за всички малки варианти на DNA.

Таблица 58 е показан анализът на компонентите на дисперсия на резултатите от честотата на вариантните алели (VAF) за всеки източник на вариация и общата вариация при всички целеви членове на панела с малки варианти на DNA.

Таблица 58 Анализ на компонентите на дисперсия на VAF за целеви малки варианти на DNA

Целеви вариант	N	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо 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_GGAATTAAGAGAAGC A_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)

Целеви вариант	N	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
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)

Имало е два малки целеви DNA варианта, за които броят на наблюденията е твърде малък, за да бъде приложен моделът на компонентите на дисперсията. За тези два целеви варианта общите SD са 0,027 за вариант chr1_27024001_C_CG и 0,001 за вариант chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Генни амплификации

Таблица 59 са показани PPC за целеви генни амплификации. PPC са 100,0% за MET и 100,0% за ERBB2.

Таблица 59 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на генни амплификации в целеви членове на комбиниран панел

Наблюдавано ниво на вариант ¹	Целеви вариант	Средна наблюдавана промяна в пъти ²	Процент на положителни обозначавания (%)	95% CI ³
~2-3xLOD	MET	5,14	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	ERBB2	2,33	100,0% (47/47)	(92,4%, 100,0%)

¹ Ниво на вариант, изчислено въз основа на средната наблюдавана промяна в пъти.

² Средна промяна в пъти, изчислена въз основа на наблюдаваните резултати от анализа.

³ Двустранният доверителен интервал от 95%, изчислен по метода за оценка на Уилсън.

PNC са 100% за всички генни амплификации.

Таблица 60 е показан анализът на компонентите на дисперсия на резултатите от промените в пъти за всеки източник на вариация и общата вариация при всички членове на панела с целеви генни амплификации.

Таблица 60 Анализ на промяната в пъти в компонентите на дисперсия за целеви генни амплификации

Целеви вариант	N	Средна промяна в пъти	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо 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

Таблица 61 показва PPC за целеви членове на MSI-H панел. PPC е 100% и за двамата членове на MSI-H панела.

Таблица 61 PPC на анализ TSO Comprehensive (EU) за откриване на MSI-H статус при целеви членове на комбиниран панел

Член на панел	Средна оценка на MSI ¹	N	Процент на положителни обозначавания (%)	95% CI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
TPSBD6	55,7	32	100,0% (32/32)	(89,3%, 100,0%)
Всички членове		68	100,0% (68/68)	(94,7%, 100,0%)

¹ Средна наблюдавана оценка на MSI, изчислена въз основа на наблюдаваните резултати от анализа.

² Двустранният доверителен интервал от 95%, изчислен по метода за оценка на Уилсън.

Таблица 62 е показан анализът на компонентите на дисперсия за оценките на MSI за всеки източник на вариация и общата вариация при всички членове на панела, обект на анализ за MSI-H статус.

Таблица 62 Анализ на компонентите на дисперсия на оценката на MSI за целеви членове на MSI-H панел

Член на панел	N	Средна оценка на MSI	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)

Член на панел	N	Средна оценка на MSI	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

За да се оцени възпроизводимостта на оценките на TMB резултатите, е извършен количествен анализ на оценките при целеви членове на панела за TMB, което представи диапазон от очаквани оценки на TMB.

Таблица 63 е показан анализът на компонентите на дисперсия за резултатите за TMB при всеки източник на вариация и общата вариация при членовете на панела за TMB. Общите SD на оценката на TMB са 1,0 (%CV = 13) за един член на панела (средна оценка на TMB = 7,6) и 1,1 (%CV = 2) за друг член на панела (средна оценка на TMB = 63,2).

Таблица 63 Анализ на компонентите на дисперсия за оценка на TMB резултата при целеви членове на TMB панел

Член на панел	N	Средна оценка TMB	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо 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)

Има 1 член на TMB панела, при когото броят на наблюденията е твърде малък (N = 2), за да бъде приложен моделът на компонентите на дисперсията. При този член на панела общото SD е 1,7.

RNA варианти

Таблица 64 показва PPC за целевите RNA варианти. PPC варира от 91,7% за KIF5B-RET до 100% за повечето RNA варианти.

Таблица 64 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на RNA варианти при целеви членове на комбиниран панел

Наблюдавано ниво на вариант ¹	Тип вариант	Целеви вариант	Средна стойност на поддържащите разчитания ²	Процент на положителни обозначавания (%)	95% CI ³
~2-3xLOD	Сливане	ACPP-ETV1	44,7	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)

Наблюдавано ниво на вариант ¹	Тип вариант	Целеви вариант	Средна стойност на поддържащите разчитания ²	Процент на положителни обозначавания (%)	95% CI ³
~2-3xLOD	Сливане	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	EGFR-GALNT13	49,8	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	EML4-ALK	49,3	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	ESR1-CCDC170	45,1	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	FGFR1-GSR	61,1	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	FGFR3-TACC3	53,5	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Сливане	KIF5B-RET	11,6	91,7% (44/48)	(80,4%, 96,7%)
<2xLOD	Сливане	MKRN1-BRAF	33,4	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Сливане	PAX3-FOXO1	70,1	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Сливане	RAF1-VGLL4	15,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	SPIDR-NRG1	51,5	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сливане	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9% (47/48)	(89,1%, 99,6%)
~2-3xLOD	Сплайс вариант	EGFR vIII	64,0	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Сплайс вариант	Пропускане на MET екзон 14	61,2	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)

¹ Ниво на вариант, изчислено въз основа средния брой наблюдавани поддържащи разчитания.

² Среден брой поддържащи разчитания, изчислен въз основа на наблюдаваните резултати от анализа.

³ Двустранният доверителен интервал от 95%, изчислен по метода за оценка на Уилсън.

PNC е 100% за всеки целеви RNA вариант, с изключение на сливането FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60% (984/988; 95% CI: 98,96% до 99,84%).

Таблица 65 е показан анализът на компонентите на дисперсия на резултатите от поддържащите разчитания за всеки източник на вариация и общата вариация при всички членове на панела с целеви RNA варианти.

Таблица 65 Анализ на компонентите на дисперсия на поддържащите разчитания за целеви RNA варианти

Целеви вариант	N	Средна стойност на поддържащи разчитания	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо 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)

Целеви вариант	N	Средна стойност на поддържащи разчитания	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
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 сплайс вариант	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Сплайс вариант с пропускане на MET екзон 14	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Вътрешнолабораторна прецизност

Проведени са две проучвания за оценка на вътрешнолабораторната прецизност за TSO Comprehensive (EU). Проучване 1 оценява сливанията на NTRK и RET и малките варианти на DNA на RET. Проучване 2 оценява TMB и MSI.

Проучване 1

Вътрешнолабораторната прецизност е оценена за сливания на NTRK1 – 3 (глиом от по-нисък клас, мултиформен глиобластом, миофибробластен сарком, секреторен карцином на гърдата), сливания на RET (рак на щитовидната жлеза и кожна тъкан от неизвестен рак) и малки варианти на DNA на RET (медуларен рак на щитовидната жлеза) с FFPE тъкани от посочените видове рак. Всяка проба е тествана на две нива на варианта: ~1x LoD (ниско ниво на вариант) и ~2 – 3x LoD (високо ниво на вариант), с изключение на пробата, съдържаща CCDC6-RET, която е тествана само на ниско ниво на вариант. Всяка от пробите на всяко тествано ниво е изпълнена в две копия при всяко събитие за приготвяне на библиотека от трима (3) оператори. Всеки оператор започва приготвянето на библиотеката в три (3)

непоследователни начални дни и секвенира на три (3) определени инструмента NextSeq 550Dx. Тествани са три (3) партиди с реагенти, което доведе до 54 наблюдения на ниво. На някои нива са направени по-малко от 54 наблюдения поради невалидни библиотеки.

Качествен анализ

Качествената съгласуваност на обозначаването на варианти е оценена поотделно за двете нива на варианти за даден вариант от обединени наблюдения по отношение на всички променливи (оператори, партиди с реагенти, инструменти, дни и репликати). Процентът положителни обозначавания (PPC, percent positive calls) и процентът отрицателни обозначавания (PNC, percent negative calls) и свързаният с тях двустранен 95% доверителен интервал (оценка на Уилсън) са обобщени в [Таблица 66](#) (малки варианти на DNA) и [Таблица 67](#) (RNA сливания).

При високото ниво на варианта (~2 - 3x LoD) анализът TSO Comprehensive (EU) демонстрира 100% за PPC и PNC за всички тествани варианти.

При ниското ниво на варианта (~1x LoD) PPC за малките варианти на DNA варира между 83,3% и 98,1%, а PPC за RNA сливанията варира между 90,7% и 100%. При вариантите с PPC < 95% средните VAF стойности (RET C634Y и RET D898_E901del) или поддържащите разчитания (NCOA4-RET и BCAN-NTRK1) са под съответните граници на откриване. При ниското ниво на варианта е постигнат 100% PNC за всички варианти.

Таблица 66 Качествени резултати за целевите DNA вариант

Ниво на вариант	Вариант	Тип вариант	Средна стойност на VAF	PPC (95% CI)	PNC (95% CI)
Ниско (~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	ДЕЛЕЦИЯ	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*	ДЕЛЕЦИЯ	0,056	98,1% (53/54) (90,2% – 99,7%)	100,0% (215/215) (98,2% – 100,0%)

Ниво на вариант	Вариант	Тип вариант	Средна стойност на VAF	PPC (95% CI)	PNC (95% CI)
Високо (~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	ДЕЛЕЦИЯ	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*	ДЕЛЕЦИЯ	0,161	100,0% (32/32) (89,3% – 100,0%)	100,0% (214/214) (98,2% – 100,0%)

* Нуклеотидните промени са изброени за всеки вариант в раздела Граница на откриване, с изключение на RET D631_L633delinsE, който е Хромозома 10, позиция 43609940, референтен код ACGAGCT, алтернативен алел А.

Таблица 67 Качествени резултати за целевите RNA сливания

Ниво на вариант	Сливане	Средна стойност на поддържащи разчитания	PPC (95% CI)	PNC (95% CI)
Ниско	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%)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (591/591) (99,4%, 100,0%)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (537/537) (99,3%, 100,0%)
	ETV6-NTRK3 (FFPE клетъчна линия)	23,1	98,1% (53/54) (90,2%, 99,7%)	
	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%)
Високо	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%)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (535/535) (99,3%, 100,0%)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (481/481) (99,2%, 100,0%)
	ETV6-NTRK3 (FFPE клетъчна линия)	28,3	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	
	NCOA4-RET	24,8	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (481/481) (99,2%, 100,0%)
	CCDC6-RET	Не е приложимо	Не е тествано	100,0% (589/589) (99,4%, 100,0%)

Количествен анализ

Извършен е анализ на компонентите на дисперсия с ограничена максимална вероятност (REML, Restricted maximum likelihood), за да се оцени общата вариация на основната непрекъсната променлива (VAF за малки варианти на DNA и поддържащи разчитания за сливания на RNA) и да се оценят компонентите на прецизността [стандартно отклонение (SD, standard deviation), коефициент на вариация (CV, coefficient of variation)] за всеки източник на вариация [оператори, инструменти, дни, партиди с реагенти, остатъчна и обща вариация]. Резултатите са представени в Таблица 68 за малките варианти на DNA и Таблица 69 за RNA сливанията.

Вариацията на VAF нараства със средната стойност, както се очаква за биномна пропорция. Вариацията в поддържащите разчитания се увеличава със средната стойност, както се очаква при числени данни. Остатъчният компонент е с най-голям принос към общата дисперсия както за малките варианти на DNA, така и за RNA сливанията и на двете нива, което подкрепя заключението, че откриването на тези варианти чрез TSO Comprehensive (EU) е независимо от оператори, партиди, инструменти и дни.

Таблица 68 Количествени резултати за SD и CV за целевите малки варианти на DNA

Ниво на VAF	Вариант	Тип вариант	Брой валидни опити	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
Ниско (~1x LoD)	RET D898_E901del	ДЕЛЕЦИЯ	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	ДЕЛЕЦИЯ	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)

Ниво на VAF	Вариант	Тип вариант	Брой валидни опити	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
Високо (~3x LoD)	RET D898_ E901del	ДЕЛЕЦИЯ	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	ДЕЛЕЦИЯ	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)

Таблица 69 Количествени резултати за SD и CV за целевите сливания на RNA

Ниво на подкрепящите разчитания	Сливане	Брой валидни опити	Средна стойност на поддържащи разчитания	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
Ниско	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,3 (11,5)	0,9 (4,7)	3,3 (16,4)	0,8 (4,1)	5,7 (28,2)	7,1 (35,2)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,4 (15,3)	1,4 (6,4)	1,8 (8,0)	0,0 (0,0)	6,0 (27,2)	7,3 (32,9)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,0 (0,0)	3,2 (15,7)	4,4 (21,5)	0,0 (0,0)	8,3 (40,8)	9,9 (48,7)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,3 (14,0)	2,4 (14,6)	2,2 (13,4)	0,0 (0,0)	4,7 (28,7)	6,1 (37,5)
	ETV6-NTRK3 (клетъчна линия)	54	23,1	4,6 (19,7)	1,2 (5,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	6,7 (29,1)	8,2 (35,5)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,7 (12,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,7 (12,6)	5,1 (38,3)	5,6 (42,2)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,0 (0,0)	1,1 (6,1)	5,4 (29,1)	0,0 (0,0)	6,2 (33,0)	8,3 (44,4)

Ниво на подкрепящите разчитания	Сливане	Брой валидни опити	Средна стойност на поддържащи разчитания	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
Високо	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,2 (19,6)	1,2 (2,1)	5,7 (9,9)	2,0 (3,5)	11,9 (20,8)	17,4 (30,5)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,2 (15,5)	0,8 (1,4)	5,6 (10,5)	2,9 (5,4)	11,3 (21,3)	15,4 (28,9)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,0 (0,0)	4,1 (7,8)	7,1 (13,6)	5,7 (11,0)	12,9 (24,9)	16,3 (31,4)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,2 (17,2)	0,4 (1,0)	6,4 (15,4)	0,0 (0,0)	10,7 (25,8)	14,4 (34,6)
	ETV6-NTRK3 (клетъчна линия)	54	28,3	7,9 (28,0)	1,0 (3,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	9,1 (32,0)	12,1 (42,6)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,1 (12,3)	0,0 (0,0)	5,9 (23,9)	0,0 (0,0)	6,8 (27,3)	9,5 (38,3)

Проучване 2

Вътрешнолабораторната прецизност е оценена за TMB и MSI. Пет NSCLC FFPE DNA проби за TMB и седем CRC FFPE проби за MSI, включващи както микросателитно стабилни (MSS) проби, така и такива с високи MSI, са използвани за оценка на прецизността на различни нива в диапазона на резултатите. Всяка от пробите е изпълнена в две копия от три (3) оператора, в три (3) дни, с три (3) подготовки на библиотеки за три (3) партиди с реагенти, като са използвани три инструмента NextSeq 550Dx, генериращи 54 наблюдения на ниво.

Качествената съгласуваност е оценена за MSI-статуса. Анализът TSO Comprehensive (EU) демонстрира 100% съгласуваност за процента положителни обозначавания и процента отрицателни обозначавания за MSI статуса. По отношение на TMB анализът TSO Comprehensive (EU) отчита оценка на TMB; качествената съгласуваност не е приложима.

Общата вариация на оценките на TMB и MSI, заедно с ролята на изходните променливи (инструменти, оператори, партиди, дни и остатъчна вариация), е количествено определена с помощта на модел на компонентите на дисперсия в обхвата на резултатите. Стандартното отклонение (SD) и коефициентът на вариация (CV) са представени в [Таблица 70](#) за TMB и [Таблица 71](#) за MSI по нива. На някои нива са направени по-малко от 54 наблюдения поради невалидни библиотеки.

Таблица 70 Количествена оценка на TMB с резултати за SD и CV

Ниво	Средна оценка TMB	Брой валидни опити	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0%)	0,06 (23%)	0,00 (0%)	0,08 (30%)	0,40 (146%)	0,41 (151%)
L2	8,4	53	0,00 (0%)	0,14 (2%)	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,71 (8%)	0,73 (9%)
L3	15,1	54	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,20 (1%)	0,00 (0%)	1,16 (8%)	1,18 (8%)
L4	20,3	53	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,06 (0%)	0,00 (0%)	0,56 (3%)	0,57 (3%)
L5	42,3	54	0,00 (0%)	0,00 (0%)	0,15 (0%)	0,00 (0%)	1,37 (3%)	1,38 (3%)

Таблица 71 Количествена оценка на MSI с резултати за SD и CV

MSI статус	Ниво	Средна оценка на MSI (%)	Брой валидни опити	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
MS-стабилни	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%)
Високи MSI	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%)

Вариациите в оценката на TMB обикновено нарастват средно аритметично, както се очаква от теоретичните разпределения на числени данни. Вариациите в оценката на MSI за нива, близки до оценка за MSI = 50, са по-големи от вариациите в оценката на MSI, по-близки до 0 или 100, в съответствие с вариабилността от теоретичните разпределения на пропорционални данни. Остатъчният компонент остава с най-голям принос към общата дисперсия за оценка както на MSI, така и на TMB, което потвърждава заключението, че резултатите са независими от оператори, партиди, инструменти и дни. Стойностите C5 и C95 около границата от 20,00% са определени за MSI чрез профил на прецизност (Таблица 72).

Таблица 72 Интервали C5-C95 за MSI

Оценка	C5	C95
MSI	17,17%	23,32%

Въпреки това, понеже MSI и TMB са сложни биомаркери, аналитичната ефективност може да варира в зависимост от пробата. Това означава, че вариацията на TMB зависи не само от стойността на TMB, но и от състава на вариантите в пробата, като например тип на варианта (SNV, Indel) и ниво на VAF (близост до границата на включване). По същия начин вариацията на MSI зависи не само от стойността на MSI, но и от състава на местата в пробата, като например броя на местата, които са нестабилни, и количественото измерение на нестабилността на всяко място.

Оценено е влиянието на туморното съдържание върху оценките на TMB и MSI. При повечето проби туморно съдържание $\geq 30\%$ има незначително въздействие върху оценките на TMB над приблизително 10 мутации на мегабаза. Оценките на TMB остават относително непроменени с увеличаване на туморното съдържание. При проби с висока MSI туморното съдържание показва положителна, линейна корелация с оценката на MSI. Пробите с висока MSI обикновено остават MSI-H, когато туморното съдържание е $\geq 30\%$. Пробите от ендометриум се държат отчетливо различно от другите типове тъкани и е установено, че се нуждаят от по-голямо количество туморно съдържание, за да бъдат наречени MSI-H.

Точност на профилиране на тумори

Откриването на варианти чрез анализ TSO Comprehensive (EU) беше сравнено с резултатите от референтни методи. Малките варианти на DNA и TMB бяха сравнени с външен валидиран метод на NGS на целия екзом. Генните амплификации бяха сравнени със същия метод на NGS на целия екзом или валидиран метод за двойна In-Situ хибридизация (DISH) за HER2 амплификации. MSI беше оценена спрямо валидиран MSI-PCR тест. RNA сплайс вариантите бяха сравнени с валидиран количествен PCR (qPCR) метод. Сливанията на ROS1 и ALK бяха сравнени с валидирани FISH анализи. Всички останали сливания бяха сравнени с комбиниран метод, състоящ се от валидиран анализ на NGS за цял екзом на RNA (RNGS1), насочен NGS панел (RNGS2) и капков цифров PCR (ddPCR).

Откриване на малък вариант на DNA

Откриването на малки варианти на DNA чрез TSO Comprehensive (EU) анализа беше сравнено с резултатите от секвениране на целия екзом (WES), което използва WES със съвпадащи туморни нормални двойки проби за обозначаване на герминативна линия и соматичен малък вариант. Сравнението между малки варианти, състоящи се от еднонуклеотидни варианти (SNV), инсерции и делеции, се основава на 124 проби от 14 различни типа тъкани, които са валидни както за TSO Comprehensive (EU), така и за WES. TSO Comprehensive (EU), но не WES анализът може да открие многонуклеотидни варианти (MNVs, 2 – 3bp), което изисква фазиране. TSO Comprehensive (EU) MNV бяха оценени като индивидуални SNV спрямо WES. Резюме на съгласуваността на ниво вариант, включително положително процентно съответствие (PPA) и отрицателно процентно съответствие (NPA) за всички обозначавания на варианти, е показано в [Таблица 73](#).

Таблица 73 Резюме на съгласуваността за обозначавания на малки варианти, оценени по състояние на герминативна линия или соматично състояние

	Обозначен соматичен WES	Обозначена герминативна линия на WES	Необозначен WES
TSO Comprehensive (EU) Обозначен	382	33 163	426

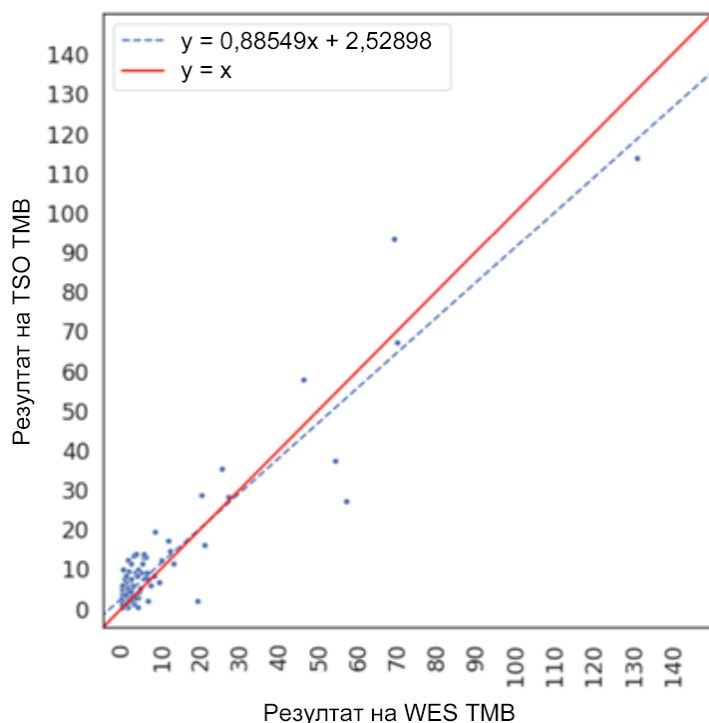
	Обозначен соматичен WES	Обозначена герминативна линия на WES	Необозначен WES
TSO Comprehensive (EU) Необозначен	69	61	70 000 481
Общо	451	33 224	70 000 907
Процентно съответствие	PPA: 85% (382/451), 95% CI: [81% – 87%]	PPA: > 99% (33 163/33 224) 95% CI: [99,8% – 99,9%]	NPA: > 99% (70 000 481/70 000 907) 95% CI: [99,999% – 99,999%]

Общо TSO Comprehensive (EU) обозначи 426 варианта, които не бяха открити при метода WES. Двеста и четири (48%) от тези варианти са имали честоти на варианти алели под прага за обозначаване на метода WES. От останалите потенциални фалшиво положителни варианти имаше доказателства за обозначаване на вариант при метода WES с ниска подкрепа. Също така много от вариантите имаха много ниско ниво на WES доказателства в съвпадащите нормални проби. Този резултат предполага, че тези варианти са пропуснати в тумора от WES поради тумор при нормално замърсяване.

Откриване на туморна мутация

Съгласуваността на TMB беше определена чрез сравняване на TMB резултати (соматични мутации/мегабаза) между WES метода и TSO Comprehensive (EU) за 124 проби с налични данни, както от TSO Comprehensive (EU), така и от WES. Анализът на линейна регресия с WES като предиктор има отсечка у от 2,53, наклон от 0,89 и коефициент на корелация на Пиърсън от 0,94 ([Фигура 3](#)).

Фигура 3 TMB корелация на оценката между WES и TSO Comprehensive (EU)



Откриване на генна амплификация

Откриването на генни ампликации чрез TSO Comprehensive (EU) анализа беше сравнено с резултатите от същия WES анализ, използвайки туморни нормални съвпадащи проби или проби само от тумор. Общо имаше 420 проби, 183 от които използваха ортогоналния туморен/нормален метод, а 237 използваха само туморния метод. Пробите бяха от 14 вида тъкани и съдържат амплификация от 55 гена. TSO Comprehensive (EU) съобщава за генни ампликации от MET и ERBB2 гени. Въпреки това точността беше оценена за всички 55 гена. Резюме за обозначаванията на генни ампликации е показано в [Таблица 74](#).

Таблица 74 Обозначавания на генни ампликации

	WES положителен	WES отрицателен
TSO Comprehensive (EU) Положителен	337	415
TSO Comprehensive (EU) Отрицателен	28	24 000
Общо	365	24 415
Процентно съответствие	PPA: 92% (337/365) 95% CI: [89%, 95%]	NPA: 98,3% (24 000/24 415) 95% CI: [98,1%, 98,5%]

Амплификациите на ERBB2 (HER2) в стомашна и гръдна тъкан бяха анализирани отделно от други генни ампликации с помощта на двоен in-situ метод на хибридизация (Dual In-Situ Hybridization Method, DISH). Бяха тествани общо 116 проби от гърда и стомах, от които 64 преди това са били характеризирани

като HER2 положителни от IHC или FISH. Една проба е неуспешна при екстракция, 3 проби не са валидни за TSO Comprehensive (EU) и 3 проби не са валидни за DISH анализ. От 108-те проби 20 (18,5%) са имали гранични резултати (между 1,5 и 2,5) близо до границата на DISH от 2,0. Резултатите за съгласуваност, включително PPA, NPA за всички проби, с изключение на граничните случаи на HER2 DISH, са показани в [Таблица 75](#).

Таблица 75 Резюме на съгласуваността между TSO Comprehensive (EU) и HER2 DISH, включително за амплификация на ген HER2

Амплификация на ген HER2 (Тъкани от гърда и стомах)	HER2 DISH амплифициран	HER2 DISH неамплифициран
TSO Comprehensive (EU) Положителен	17 (включително 1 на границата)	13 (включително 1 на границата)
TSO Comprehensive (EU) Отрицателен	10 (включително 6 на границата)	68 (включително 12 на границата)
Процентно съответствие, включително гранични случаи	PPA: 63% (17/27) 95% CI: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95% CI: [74%, 90%]
Процентно съответствие с изключение на граничните случаи	PPA: 80% (16/20) 95% CI: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95% CI: [72%, 90%]

Откриване на микросателитна нестабилност

Откриването на микросателитна нестабилност чрез TSO Comprehensive (EU) анализа беше сравнено с резултатите от валидиран MSI-PCR тест, който използва туморни нормални съвпадащи проби за тестване. Бяха сравнени общо 195 проби, отговарящи на изискването за туморно съдържание от $\geq 30\%$ и представляващи 14 типа тъкани. С MSI-PCR се оценяват 5 места и има 3 резултата – MSS (без нестабилни места), ниски MSI (едно нестабилно място) и високи MSI (две или повече нестабилни места). С TSO Comprehensive (EU) се оценяват до 130 микросателитни места и пробите се квалифицират само като MSS или високи MSI ($\geq 20\%$ нестабилни места). Ниските MSI бяха групирани с MSS резултати за MSI-PCR. Анализът на съгласуваността е показан в [Таблица 76](#).

Таблица 76 Резюме на анализа на съгласуваността между TSO Comprehensive (EU) и MSI-PCR за нестабилност на DNA микросателит

Нестабилност на MSI	PCR високи MSI	PCR ниски MSI	PCR MSS
TSO Comprehensive (EU) Нестабилни (високи-MSI)	40	2	0
TSO Comprehensive (EU) Стабилни (MSS)	3	0	150
Общо	43	2	150

Нестабилност на MSI	PCR високи MSI	PCR ниски MSI	PCR MSS
Процентно съответствие	PPA: 93% (40/43) 95% CI: [81%, 98%]	NPA: 99% (150/152) 95% CI: [95%, > 99%]	

Откриване на RNA сплайс варианти

Точността за откриване на сплайс варианти беше изчислена чрез сравняване на резултатите от TSO Comprehensive (EU) с qPCR анализи за EGFRvIII и Met Exon 14del, включително една известна положителна RNA за всеки от сплайс вариантите. Анализът на съгласуваност беше извършен върху общо 230 уникални FFPE RNA проби от 14 типа тъкани с налични данни както от TSO Comprehensive (EU), така и от референтния метод. Всички проби са тествани за MET Exon 14del, докато EGFRvIII са тествани, съответно, само в мозъчна тъкан. Три проби, обозначени положителни за MET Exon 14del чрез qPCR, но не чрез TSO Comprehensive (EU), имаха среден Ct > 37 и бяха под нивото на TSO Comprehensive (EU) LoD. [Таблица 77](#) обобщава резултатите от проучването за съгласуваност.

Таблица 77 Резюме на анализа на съгласуваност между TSO Comprehensive (EU) и qPCR анализ за RNA сплайс варианти

RNA сплайс варианти	qPCR положителен	qPCR отрицателен
TSO Comprehensive (EU) Положителен (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Отрицателен (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) Положителен (Met Exon 14Del)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Отрицателен (Met Exon 14Del)	3	217
Общо	7	230
Процентно съответствие	PPA: 57% (4/7) 95% CI: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95% CI: [98%, 100%]

Откриване на сливане на RNA

Сравнение с комбинирания метод

TSO Comprehensive (EU) сливанията бяха сравнени с комбиниран метод, състоящ се от секвениране на цял RNA екзом, използвайки NGS панел (RNGS1), целеви NGS фузионен панел (RNGS2) и капков цифров PCR (ddPCR).

Методът RNGS1 се припокрива с всички гени, за които TSO Comprehensive (EU) може да открие сливания. Въпреки това границата на откриване на метода RNGS1 беше 4X – 8X тази на TSO Comprehensive (EU) въз основа на броя на поддържащите разчитания, наблюдавани при припокриващите се обозначавания за сливане. Следователно комбиниран метод, използващ два допълнителни метода с по-голяма чувствителност, но по-малко широчина за сливания, е използван с метода WES (RNGS1).

Общо 255 уникални RNA проби, представляващи 14 типа тъкани и преминаващи TSO Comprehensive (EU) показатели, бяха тествани с RNGS1. Две проби са били невалидни за КК на пробата RNGS1 и бяха изключени от допълнителен анализ. От 82 сливания, обозначени от TSO Comprehensive (EU), 4 бяха изключени от оценка поради откази на КК на пробата RNGS1, а 7 допълнителни сливания не бяха обозначавани поради липса на целите в панела RNGS1. От останалите 71 сливания, обозначени от TSO Comprehensive (EU), 9 сливания бяха потвърдени от RNGS1. RNGS1 обозначи 4 сливания, които не са обозначени от TSO Comprehensive (EU).

От 62 сливания, които са положителни за TSO Comprehensive (EU) и не са открити от RNGS1, 13 се припокриват и са потвърдени от RNGS2. Едно сливане беше обозначено от RNGS2, но не беше обозначено от TSO Comprehensive (EU).

След това се използва капков цифров PCR за сливания, обозначени от TSO Comprehensive (EU), които не са обозначени или не са обозначавани от RNGS1 и не могат да бъдат оценени от RNGS2 (49). Освен това ddPCR беше използван за преоценка на 2 от 4-те фалшиво отрицателни сливания за TSO Comprehensive (EU) с RNGS1 и 2 от 9-те съгласувани сливания за TSO Comprehensive (EU) и RNGS1. Пет отрицателни проби за сливане бяха включени с тестване на всяка положителна фузионна проба, за да се гарантира специфичност. Осемнадесет сливания не са тествани с ddPCR поради невъзможност за проектиране на праймери/сонди, няколко генни партньори за сливането или недостатъчен оставащ FFPE материал. За ddPCR праймерите и сондите са проектирани спрямо наблюдаваните точки на прекъсване в TSO Comprehensive (EU) анализа.

Общо 52 сливания бяха открити от ddPCR, 41 от тези сливания бяха обозначени от TSO Comprehensive (EU), но не бяха обозначени или не бяха обозначавани от RNGS1. Девет сливания бяха обозначени от ddPCR, но отрицателни в TSO Comprehensive (EU) или RNGS1. Две ddPCR положителни сливания потвърдиха 2-те съгласувани сливания за TSO Comprehensive (EU) и RNGS1. Не е открито сливане от ddPCR за 2-те повторно оценени фалшиво отрицателни TSO Comprehensive (EU) с RNGS1. Те обаче са отчетени като фалшиво отрицателни резултати въз основа на сравнението с RNGS1.

Методите за комбинирани резултати за съгласуваност RNGS1, RNGS2 и ddPCR за сливания са показани в [Таблица 78](#).

Тези 63 сливания, които съвпадат с комбинирания метод, представляват 43 гена в TSO Comprehensive (EU) панела. Въпреки това сливанията са допустими за отчитане само от 23-те гена, посочени в [TSO Comprehensive \(EU\) Генен панел за анализ на страница 2](#).

Таблица 78 Кръстосана таблица на резултатите от TSO Comprehensive (EU) спрямо комбиниран метод за сливания на RNA (253 проби)

Сливания	Комбиниран метод положителен	Комбиниран метод отрицателен
TSO Comprehensive (EU) Положителен	63 ¹	18
TSO Comprehensive (EU) Отрицателен	14 ²	13 821
Общо	77	13 839
Процентно съответствие	PPA: 82% (63/77) 95% CI: [72%, 89%]	NPA: 99,9% (13 821/13 839) 95% CI: [99,8%, 99,9%]

¹ 63 TSO Comprehensive (EU) истински положителни резултати = 9 положителни в съответствие с RNGS1 + 13 положителни в съответствие с RNGS2 + 41 положителни в съответствие с ddPCR.

² 14 TSO Comprehensive (EU) фалшиво отрицателни резултати = 4 отрицателни, които не съответстват на RNGS1 + 1 отрицателен, не съответства на RNGS2 + 9 отрицателни, не съответстват на ddPCR.

Сравнение с FISH метод за ROS1 и ALK сливания

Двадесет и пет NSCLC проби бяха тествани от FISH както за ROS1, така и за ALK сливания и 5 допълнителни NSCLC проби бяха тествани за сливане на ROS1. Осем проби не можах да бъдат тествани от FISH за ROS1 поради неподходяща тъкан. Две ROS1 и едно ALK сливане бяха открити, както от TSO Comprehensive (EU), така и от FISH. Не са наблюдавани противоречиви резултати. [Таблица 79](#) обобщава резултатите за съгласуваност на TSO Comprehensive (EU) и метода FISH за ROS1 и ALK сливания.

Таблица 79 Обобщение на резултатите за съгласуваност на TSO Comprehensive (EU) и метода FISH за ROS1 и ALK сливания

ALK+ROS1	FISH положителен	FISH отрицателен
TSO Comprehensive (EU) Положителен	3	0
TSO Comprehensive (EU) Отрицателен	0	44
Общо	3	44
Процентно съответствие	PPA: 100% (3/3) 95% CI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95% CI: [92%, 100%]

Валидност на пробата

Валидността на пробата (първи опит) беше измерена за 181 уникални RNA и 272 уникални DNA проби от FFPE блокове ≤ 5-годишна възраст. Тези проби са избрани въз основа на типа тъкан и наличния материал; валидността на анализа беше неизвестна. Показателите за контрол на качеството на библиотеката трябва да отговарят на изискванията, за да може типът на варианта да се счита за валиден. Валидността на пробата беше оценена поотделно за всеки от типовете варианти (малки варианти на DNA/TMB, MSI, генни амплификации, сливания/сплайс варианти) и са показани в [Таблица 80](#).

Таблица 80 Валидност на пробата

Тип вариант	Валидност на пробата
Сливания/сплайс варианти (RNA)	76%
Малки DNA варианти/TMB	75%
MSI	72%
Генна амплификация	94%

Обобщение на аналитичното валидиране за обозначавания за туморно профилиране

Въз основа на данните за граница на откриване, прецизност, възпроизводимост и точност TSO Comprehensive (EU) е аналитично валидиран за следното:

- Малки варианти на DNA – SNV, MNV, инсерции и делеции
- TMB
- MSI
- MET и ERBB2 (HER2) генни амплификации (вижте [TSO Comprehensive \(EU\) Генен панел за анализ на страница 2](#)).
- 23 гена, за които могат да бъдат открити сливания (вижте [TSO Comprehensive \(EU\) Генен панел за анализ на страница 2](#)).
- EGFR и MET сплайс варианти (вижте [TSO Comprehensive \(EU\) Генен панел за анализ на страница 2](#)).

Клинична ефективност на NTRK

За валидиране на анализа TSO Comprehensive (EU) като съвместна диагностика (CDx) за подбор на пациенти за лечение с VITRAKVI® (ларотректиниб), проби от пациенти, включени в клиничните изпитвания на ларотректиниб (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; наричани общо проби от изпитвания на ларотректиниб) чрез използване на краен срок за данните 15 ЮЛИ 2019 г., допълнени с FFPE тъканни проби от търговската мрежа, бяха тествани в подкрепа на проучване на точността на анализа TSO Comprehensive (EU) и клинично свързващо проучване.

NCT02122913 е многоцентрово, открито, фаза 1 проучване за повишаване на дозата при възрастни пациенти с напреднали солидни тумори (всички участници), неизбрани за положителен за NTRK сливания рак. След частта за повишаване на дозата от проучването беше започнато разширяване на дозата за пациенти с документиран положителен за NTRK сливане рак и за пациенти, за които изследователят смята, че могат да се възползват от високо селективен TRK инхибитор. NAVIGATE NCT02576431 е текущо, многоцентрово, открито, фаза 2 проучване тип „кошница“ при пациенти на възраст 12 и повече години с повтарящи се напреднали солидни тумори с документирано NTRK сливане, оценено от външна лаборатория. SCOUT NCT02637687 е текущо, многоцентрово, открито, фаза 1/2 проучване при педиатрични пациенти на възраст от раждането до 21 години с напреднали солидни или първични тумори на централната нервна система (ЦНС).

От положителни за NTRK сливане пациенти, включени в проучването на анализа TSO Comprehensive (EU), 164 формираха набора за разширена първична ефикасност на ларотректиниб (ePAS4).

Проучването за точност за откриване на NTRK1, NTRK2, NTRK3 сливания

Точността на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на NTRK сливания (NTRK1, NTRK2 или NTRK3) при пациенти със солидни тумори беше демонстрирана чрез оценка на съгласуваността на резултатите от NTRK сливания между анализ TSO Comprehensive (EU) и валидиран ортогонален метод NGS.

Проведено е ретроспективно, неинтервенционално проучване. Пробите от изпитвания на ларотректиниб и допълнителните проби бяха тествани с анализ TSO Comprehensive (EU) в един външен център и с ортогонален метод в централна лаборатория. Точността на обозначаванията на NTRK сливанията чрез анализ TSO Comprehensive (EU) беше оценена спрямо ортогоналния метод; положително процентно съответствие (PPA), отрицателно процентно съответствие (NPA) и бяха изчислени свързаните двустранни 95% доверителни интервали (CI).

Имаше 516 проби, тествани с анализа TSO Comprehensive (EU) и/или ортогоналния метод. От тези проби 499 са тествани по двата метода. Седемнадесет от 516 проби не са тествани с един от анализите поради неуспешна екстракция, неизвестна причина (за ортогоналния метод) или отклонение от протокола. От 499 проби, тествани по двата метода, 170 (34,1%) са проби от изпитвания на ларотректиниб, а 329 (65,9%) са допълнителни проби.

Кръстосана табуляция на резултатите за 499 проби е показана в [Таблица 81](#). От 499 проби, 85 проби са имали невалидни резултати от анализа TSO Comprehensive (EU); от тези 85, 53 са имали и невалидни резултати от ортогоналния метод. Допълнителни 7 проби са имали невалидни резултати от ортогоналния метод. Така 407 от 499 проби са имали валидни резултати от двата метода.

Таблица 81 Проучване за точност на NTRK: Кръстосано представяне в таблица на резултат от TSO Comprehensive (EU) спрямо резултат от ортогонален метод за откриване на NTRK сливания

Резултат от анализ TSO Comprehensive (EU)	Резултати от ортогонален метод			
	Положителен за NTRK сливане	Отрицателен за NTRK сливане	Невалиден	Общо
Положителен за NTRK сливане	114	16	1	131
Отрицателен за NTRK сливане	4	273	6	283
Невалидни*	4	28	53	85
Общо	122	317	60	499

* Невалидни резултати от анализа TSO Comprehensive (EU) се получават от ниво на проба и на изпълняване.

Анализите за съответствие, като се изключат и като се включат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU), са показани в [Таблица 82](#). Като се изключат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU), PPA е 96,6% (114/118; 95% CI: 91,5% – 99,1%), а NPA е 94,5% (273/289; 95% CI: 91,2% – 96,8%).

Таблица 82 Проучване за точност на NTRK: PPA и NPA на анализа TSO Comprehensive (EU) в сравнение с резултата от ортогоналния метод за откриване на NTRK сливания

Измерване на съответствие	Като се изключат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU)		Като се включат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU)	
	Съответствие, % (n/N)	95% CI*	Съответствие, % (n/N)	95% CI*
PPA	96,6% (114/118)	91,5% – 99,1%	93,4% (114/122)	87,5% – 97,1%
NPA	94,5% (273/289)	91,2% – 96,8%	86,1% (273/317)	81,8% – 89,7%

* 95% CI, основан на (точен) метод на Clopper-Pearson.

Клинично свързващо проучване за откриване на NTRK1, NTRK2, NTRK3 сливания

Клиничната валидност на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на NTRK1, NTRK2 или NTRK3 сливания при пациенти със солидни тумори, които могат да се възползват от лечение с ларотректиниб, е демонстрирана в клинично свързващо проучване. Проучването е проведено, за да се оцени клиничната ефективност на анализа TSO Comprehensive (EU) за идентифициране на положителни пациенти за NTRK1, NTRK2 или NTRK3 сливания за лечение с ларотректиниб и за оценка на съгласуваността между анализа TSO Comprehensive (EU) и локалните тестови (LT) методи (използвани за определяне на състоянието на NTRK сливания за клиничните изпитвания на ларотректиниб).

LT методите включват NGS, флуоресцентна in situ хибридизация (FISH), полимеразна верижна реакция (PCR) и NanoString анализи. NTRK сливания (ETV6 NTRK3) бяха изведени за пациенти с инфантилен фибросарком, които имат документирана транслокация на ETV6, идентифицирана от FISH. Повечето от 235-те пациенти в проучването на ларотректиниб с известно състояние на NTRK сливане са били тествани чрез NGS методи.

Проучванията NAVIGATE NCT02576431 и SCOUT NCT02637687 продължават да включват участници. Към крайния срок на данните 15 ЮЛИ 2019 г. са включени 279 пациенти. От 279 пациенти 208 са били положителни за NTRK сливане. От 208 положителни пациенти 164 формират ларотректиниб ePAS4.

Първата крайна точка за анализ на ефикасността на ларотректиниб беше общата честота на отговора (ORR) според оценката на независимия комитет за преглед (IRC) в обединен набор от данни от 3-те клинични проучвания. ORR беше оценена въз основа на дела на пациентите с най-добър общ отговор на потвърден пълен отговор или потвърден частичен отговор въз основа на критериите RECIST, версия 1.1. ORR в ePAS4 за ларотректиниб е 72,6% (95% CI [65,1%, 79,2%]) и включва пациенти с 16 различни типа тумори.

Отчетност за пробите

Наборът от проби включва представяне на широк спектър от типове тумори и проби от педиатрични и възрастни пациенти.

Към 15 ЮЛИ 2019 г. има 279 пациенти, включени в проучванията на ларотректиниб. От тях 235 пациенти са имали известно състояние на NTRK сливане, определено чрез метод на LT: 208 са положителни и 27 са отрицателни. За 44 пациенти състоянието на NTRK сливане е неизвестно, тъй като не е необходимо тестване за пригодност на пациентите във фазите на повишаване на дозата на проучванията NCT02122913 и SCOUT NCT02637687. За клиничното свързващо проучване на анализа TSO Comprehensive (EU) проби от пациенти в изпитване на ларотректиниб, включени към 15 ЮЛИ 2019 г., с известно състояние на NTRK сливане (208 положителни пациенти и 27 отрицателни пациенти) и допълнителните проби, определени като отрицателни за NTRK сливане чрез представителни методи на LT, бяха пригодни за това проучване.

От 208 положителни проби от изпитване на ларотректиниб 154 имаха проба, налична за тестване за анализа TSO Comprehensive (EU). От тях 138 имат валидни резултати. Петнадесет проби бяха невалидни поради неуспешни показатели за качество на секвенирането на проби и 1 проба не беше тествана поради отклонение от протокола. От 27 отрицателни проби от изпитване на ларотректиниб 24 имаха проба, налична за тестване. От тях 22 имаха валидни резултати от анализа TSO Comprehensive (EU). Две проби бяха невалидни поради неуспешни показатели за качество на секвениране на пробите.

Допълнителните проби бяха скринирани с помощта на един от двата представителни метода на LT. Бяха набавени и изследвани за туморно съдържание над 350 проби. От допълнителните проби, отговарящи на изискванията за проби, 266 бяха успешно екстрахирани и потвърдени като отрицателни за NTRK сливане чрез представителен метод на LT. От тези проби 260 бяха налични за тестване за анализа TSO Comprehensive (EU), от които 222 имаха валидни резултати. Имаше 38 проби, които бяха невалидни поради неуспешни показатели за секвениране на пробите (n = 25) или неуспешно секвениране на изпълняване (n = 13). Общият отрицателен набор за NTRK сливания се състои от 222 допълнителни проби и 22 проби от изпитвания на ларотректиниб.

Резултати за съгласуваност

Съответствие на резултати от TSO Comprehensive (EU) по отношение на резултатите от LT методите, със и без невалидните резултати от TSO Comprehensive (EU), са показани в [Таблица 83](#).

Таблица 83 Клинично свързващо проучване NTRK: Съгласуваност между анализа TSO Comprehensive (EU) и LT методите за откриване на NTRK сливания

Измерване на съответствие	Като се изключат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU)		Като се включат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU)	
	% съответствие (n/N)	95% CI*	% съответствие (n/N)	95% CI*
PPA	89,1% (123/138)	82,7% – 93,8%	80,4% (123/153)	73,2% – 86,4%
NPA	96,3% (235/244)	93,1% – 98,3%	82,7% (235/284)	77,8% – 87,0%
OPA	93,7% (358/382)	90,8% – 95,9%	81,9% (358/437)	78,0% – 85,4%

* Двустранните 95% CI са изчислени чрез използване на (точен) метод на Clopper-Pearson.

Анализът на чувствителността спрямо липсващите резултати от анализа TSO Comprehensive (EU) показаха стабилността на анализа на съответствието. Липсващи резултати от анализа TSO Comprehensive (EU) за положителни за NTRK сливане пациенти от LT (n = 70) са приписани с помощта на модел на логистична регресия. Оценките на съответствието, включително приписаните стойности, са показани в Таблица 84.

Таблица 84 Клинично свързващо проучване NTRK: Съгласуваност между анализа TSO Comprehensive (EU) и методите за LT за откриване на NTRK сливания, включително приписани стойности за положителни пациенти в LT с липсващи резултати от анализа TSO Comprehensive (EU)

Измерване на съответствие	% съответствие	95% CI*
PPA	85,2%	78,6% – 91,7%
NPA	96,3%	93,9% – 98,7%
OPA	91,2%	87,9% – 94,5%

Липсващите резултати от анализа TSO Comprehensive (EU) за отрицателни за сливания пациенти в LT не са приписани.

* Двустранните 95% CI са изчислени въз основа на метода на Boot с множество приписвания. Методът на Boot с множество приписвания е стъпка за стартиране, вложена в множество приписвания (Schomaker и Heumann 2018).

Съответствията между анализа TSO Comprehensive (EU) и LT по тип метод (например RNA NGS, FISH) са показани в Таблица 85.

Таблица 85 Клинично свързващо проучване NTRK: Съгласуваност между анализа TSO Comprehensive (EU) и LT методите за откриване на NTRK сливания чрез тип метод на LT

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

Не е изчислено: за подгрупи с брой на пробите < 5, статистиката на съответствието не е изчислена.

¹ Двустранните 95% CI са изчислени чрез използване на (точен) метод на Clopper-Pearson.

² Включва NGS методи, които използват само RNA и както DNA, така и RNA.

От 437 проби, тествани с анализа TSO Comprehensive (EU), 24 са имали противоречиви резултати с LT: 15 са били положителни в LT и отрицателни в анализа TSO Comprehensive (EU), а 9 са били отрицателни в LT и положителни в анализа TSO Comprehensive (EU). От 24 проби с противоречиви резултати, 8 бяха тествани с DNA NGS LT метод, 14 с RNA NGS LT метод и 2 с FISH.

Валидиран независим NGS метод потвърди резултатите от анализа TSO Comprehensive (EU) в 14 от 24-те проби с противоречиви резултати. За останалите 10 проби резултатите от анализа TSO Comprehensive (EU) не съответстват както на LT, така и на независимия NGS метод.

Резултати за клинична ефикасност

В рамките на кохорта ePAS4 ефикасността на ларотректиниб в TSO Comprehensive (EU) положителна, положителна популация в LT (97 пациенти, ORR=78,4%, 95% CI [68,8%, 86,1%]) е подобна на ефикасността на ларотректиниб в общата популация на ePAS4 (164 пациенти, ORR=72,6%, 95% CI [65,1%, 79,2%]) (Таблица 86). От 97 TSO Comprehensive (EU) положителни пациенти в ePAS4, 28 (28,9%) пациенти са постигнали пълен отговор/пълен хирургичен отговор и 48 (49,5%) пациенти са постигнали частичен отговор.

От 13 TSO Comprehensive (EU) отрицателни, положителна популация в LT, 1 (7,7%) показаха пълен отговор, а 2 (15,4%) показаха частичен отговор при терапия с ларотректиниб.

Таблица 86 Клинично свързващо проучване NTRK: ORR за положителни пациенти в LT чрез LT и TSO Comprehensive (EU) резултати в ePAS4

		Положителни за сливане в LT N=164	TSO Comprehensive (EU) Положителни и положителни в LT N=97	TSO Comprehensive (EU) Отрицателни и положителни в LT N=13
Най-добър цялостен отговор, n (%)	Пълен отговор	31 (18,9%)	22 (22,7%)	1 (7,7%)
	Пълен хирургичен отговор	8 (4,9%)	6 (6,2%)	0
	Частичен отговор	80 (48,8%)	48 (49,5%)	2 (15,4%)
	Стабилно заболяване	25 (15,2%)	13 (13,4%)	4 (30,8%)
	Прогресивно заболяване	13 (7,9%)	6 (6,2%)	5 (38,5%)
	Неоценяем	7 (4,3%)	2 (2,1%)	1 (7,7%)

		Положителни за сливане в LT N=164	TSO Comprehensive (EU) Положителни и положителни в LT N=97	TSO Comprehensive (EU) Отрицателни и положителни в LT N=13
Честота на цялостен отговор	Брой пациенти, n	164	97	13
	Брой пациенти с CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (95% CI*)	72,6% (65,1%, 79,2%)	78,4% (68,8%, 86,1%)	23,1% (5,0%, 53,8%)

Съкращения: CR = пълен отговор, PR = частичен отговор, sCR = пълен хирургичен отговор.

*Двустранният 95% доверителен интервал се изчислява чрез използване на (точен) метод на Clopper-Pearson. При 54 пациенти липсват резултати от анализа TSO Comprehensive (EU).

Данните от това проучване са в подкрепа на безопасността и ефективността на анализа TSO Comprehensive (EU), когато се използва за идентифициране на пациенти със солидни тумори с NTRK сливания, които може да са пригодни за лечение с ларотректиниб.

Литература

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Достъп 3 октомври 2016 г.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Достъп 3 октомври 2016 г.

Хронология на редакциите

Редакция	Дата	Описание на промяната
v06	февруари 2023 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Допълнителни декларации в раздел Ограничения • Езикови актуализации за конвенция, граматична коректност и яснота • Корекция на Таблици 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Декларация за наличие на утайки в реагента FSM • Актуализирани спецификации на термоциклера и ваничката в списъка с оборудване и материали
v05	септември 2022 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Добавени номера на части за модул за анализ TSO Comprehensive v2.3.5 • Премахнати номера на части за модул за анализ TSO Comprehensive v2.3.3 • Актуализирана терминология в раздел Граница на празна проба
v04	юни 2022 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Добавени номера на части за модул за анализ TSO Comprehensive v2.3.5 • Премахнати номера на части за модул за анализ TSO Comprehensive v2.3.3 • Актуализирана терминология в раздел Граница на празна проба
v03	април 2022 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Добавена информация за характеристиките на производителността, свързана с NTRK сливания • Добавена маркировка „САМО ЗА ИЗНОС“ • Актуализирана декларация за предназначена употреба за добавяне на иск за CDx на NTRK1-3 • Разширена информация за компонентите на продукта, за да включат номера на части на софтуерни компоненти
v02	февруари 2022 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Поправена грешка в табличната справка • Добавено ограничение по отношение на варианти от герминативната линия и соматични варианти • Пояснен изказ относно откриването на генна амплификация
v01	Декември 2021 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Актуализирани ограничения на процедурата • Пояснени спецификации на магнитната стойка и термоциклера в списъците на оборудването и материалите
v00	Ноември 2021 г.	Първоначална версия

Патенти и търговски марки

Настоящият документ и съдържанието му са собственост на Illumina, Inc. и нейните филиали („Illumina“) и са предназначени само за употреба по силата на договор от страна на клиента и във връзка с използването на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ, и с никаква друга цел. Този документ и съдържанието му не трябва да се използват или разпространяват за никаква друга цел и/или по друг начин да бъдат съобщавани, разкривани или възпроизвеждани по какъвто и да е начин без предварителното писмено съгласие от страна на Illumina. Illumina не предоставя посредством този документ никакъв лиценз за свой патент, търговска марка, авторско право или права по силата на общото право, нито подобни права на която и да е трета страна.

Инструкциите в този документ трябва да се следват строго и изрично от страна на квалифициран и правилно обучен персонал, за да се гарантират правилната и безопасната употреба на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ. Цялото съдържание на този документ трябва да бъде прочетено и разбрано напълно, преди да се използва(т) такъв(такви) продукт(и).

АКО ВСИЧКИ ИНСТРУКЦИИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ, НЕ БЪДАТ НАПЪЛНО ПРОЧЕТИ И ИЗРИЧНО СПАЗВАНИ, ТОВА МОЖЕ ДА ДОВЕДЕ ДО ПОВРЕДА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), НАРАНЯВАНЕ НА ЛИЦА, ВКЛЮЧИТЕЛНО НА ПОТРЕБИТЕЛИ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА, И УВРЕЖДАНЕ НА ДРУГО ИМУЩЕСТВО, И ЩЕ ОТМЕНИ ВСЯКАКВА ГАРАНЦИЯ, ПРИЛОЖИМА ЗА ПРОДУКТА(ИТЕ).

ILLUMINA НЕ ПОЕМА НИКАКВА ОТГОВОРНОСТ В РЕЗУЛТАТ НА НЕПРАВИЛНАТА УПОТРЕБА НА ПРОДУКТА(ИТЕ), ОПИСАН(И) В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ (ВКЛЮЧИТЕЛНО ТЕХНИ ЧАСТИ ИЛИ СОФТУЕР).

© 2023 г. Illumina, Inc. Всички права запазени.

Всички търговски марки са собственост на Illumina, Inc. или съответните им притежатели. За специфична информация относно търговските марки отнесете се към www.illumina.com/company/legal.html.

Информация за контакт



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

CE



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

Етикетиране на продукта

За пълна справка за символите, които може да се появяват на опаковката и етикетите на продукта, вижте легендата на символите за Вашия комплект на support.illumina.com в раздела *Documentation* (Документация).