

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Navodila za uporabo

SAMO ZA DIAGNOSTIČNO UPORABO IN VITRO. SAMO ZA IZVOZ.

Predvidena uporaba

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) je *in vitro* diagnostični test, ki uporablja tarčno sekvenciranje naslednje generacije za odkrivanje variant v 517 genih z uporabo nukleinskih kislin, pridobljenih iz vzorcev tumorskega tkiva, fiksiranih s formalinom, vklopljenih v parafin (FFPE), pri bolnikih z rakom s čvrstimi malignimi novotvorbami z uporabo instrumenta Illumina® NextSeq™ 550Dx. Test se lahko uporablja za odkrivanje variant posameznega nukleotida, multinukleotidnih variant, insercij, delecij in pomnožitev gena iz DNK ter genske fuzije in spojitvene variante iz RNK. Test poroča tudi o rezultatu mutacijskega bremena tumorja (TMB) in stanju mikrosatelitne nestabilnosti (MSI).

Test je namenjen kot spremljevalna diagnostika za identifikacijo bolnikov z rakom za zdravljenje s tarčnim zdravljenjem, navedenim v [Preglednica 1](#), v skladu z odobrenim označevanjem terapevtskega izdelka. Poleg tega je test namenjen zagotavljanju informacij o profiliranju tumorjev, ki jih uporabljajo kvalificirani zdravstveni delavci v skladu s strokovnimi smernicami, in ni odločilen ali zavezujoč za označeno uporabo katerega koli specifičnega terapevtskega izdelka.

Preglednica 1 Indikacije za spremljevalno diagnostiko

Vrsta tumorja	Biološki označevalci	Tarčno zdravljenje
Čvrsti tumorji	Genske fuzije NTRK1, NTRK2 in NTRK3	VITRAKVI® (larotreklinib)

Povzetek in razlaga testa

Klinični opis

Rak je vodilni vzrok smrti po vsem svetu in lahko nastane v katerem koli tkivu.^{1, 2} Analiza genetske osnove raka je pomembna za prepoznavanje bolnikov, ki jim lahko koristi tarčno zdravljenje, in za razvoj novih metod zdravljenja. Številni geni so bili vpleteni v nastanek ali napredovanje raka, mnogi raki pa nosijo različne variante, ki vplivajo na te gene in njihove funkcije. Te variante lahko vključujejo genske mutacije, kot so variante posameznega nukleotida (SNV-ji), multi-nukleotidne variante (MNV-ji), insercije ali delecije, pomnožitve genov, genske fuzije in spojitvene variante. Druga posledica mutacij genov raka je prezentacija neoantigenov, ki lahko izzovejo imunske odzive, specifične za rak. Mutacijski status raka lahko predstavljata TMB in MSI, ki sta genomski podpisa, povezana z genomsko nestabilnostjo in prezentacijo neoantigena raka.

TruSight Oncology Comprehensive je kvalitativni test celovitega genomskega profiliranja (CGP) z uporabo sekvenciranja naslednje generacije (NGS), ki na splošno ocenjuje genomske variante v velikem naboru genov, povezanih z rakom, navedenih v [Preglednica 2](#). Test zazna majhne variante v 517 genih ter pomnožitve genov, fuzije in spojivne variante, kot je navedeno v [Preglednica 2](#). Test zagotavlja pokritost kodirajočega zaporedja za vse gene, razen za TERT, pri čemer je zajeta le regija promotorja, ter oceni rezultat TMB in status MSI. Te testne tarče vključujejo vsebino, ki jo navajajo strokovne organizacije, in druge glavne smernice v ZDA. Neodvisne publikacije konzorcijev in pozne faze farmacevtskih raziskav so prav tako vplivale na zasnovo testa TSO Comprehensive.

Za seznam regij, ki so izključene iz določanja variant, glejte *TruSight Oncology Comprehensive Block List (Seznam blokiranih)* (dokument št. 200009524), ki je na voljo na [podpornem spletnem mestu](#) družbe Illumina.

V [Preglednica 2](#) so opredeljene naslednje kategorije vrst variant: Majhna varianta DNK (S), pomnožitev gena (A), fuzija (F) in spojivna varianta (Sp). Majhne variante DNK vključujejo SNV, MNV ter insercije in delecije.

Preglednica 2 TSO Comprehensive (EU) Nabor genov za test

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

Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice	Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice	Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice
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	PARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTB	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	KLIK	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

Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice	Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice	Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
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

Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice	Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice	Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	METODA	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S

Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice	Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice	Št.	Entrez ID	Gen	Vrsta različice
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo

Načela postopka

Test TSO Comprehensive (EU) je porazdeljen test, ki se izvaja ročno z uporabo ekstrahirane nukleinske kisline kot vhodnega materiala. DNK in/ali RNK, pridobljen iz tkiva, fiksiranega s formalinom in vklopljenega v parafin (FFPE), se uporablja za pripravo knjižnic, ki se nato obogatijo za gene, povezane z rakom, in sekvencirajo na Instrument NextSeq 550Dx.

Test TSO Comprehensive (EU) vključuje naslednje postopke.

- **Priprava in obogatitev knjižnice** – za RNK se skupno 40 ng pretvori v dvoverižno komplementarno DNK (cDNK). Pri genomski DNK (gDNK) se 40 ng gDNK razgradi v majhne fragmente. Univerzalni adapterji za sekvenciranje se vežejo na fragmente cDNK in gDNK. V vsako knjižnico so vključena zaporedja adapterjev P5 in P7, da se omogoči zajem fragmentov knjižnice na površini pretočne celice med sekvenciranjem. Adapterji vključujejo indeksna zaporedja i5 in i7 za identifikacijo vsakega posameznega vzorca in v primeru knjižnic iz vzorcev gDNK posamezne molekule z uporabo edinstvenih molekulskih identifikatorjev (UMI). Knjižnice se nato obogatijo za specifične gene zanimanja z uporabo metode, ki temelji na zajemu. Zaporedja biotiniliranih sond, ki pokrivajo genska območja zanimanja, na katera je usmerjen test, hibridizirajo s knjižnicami. Sonde in hibridizirane tarčne knjižnice se izolirajo od netarčnih knjižnic z zajemanjem s streptavidinskimi magnetnimi delci. Tarčne obogatene knjižnice se izperejo in pomnožijo. Količina vsake obogatene knjižnice se nato normalizira z metodo na osnovi kroglic, da se zagotovi enaka zastopanost v združenih knjižnicah za sekvenciranje.
- **Sekvenciranje in primarna analiza** – Normalizirane obogatene knjižnice se združijo in gručijo na pretočni celici, nato pa se sekvencirajo na NextSeq 550Dx s kemijo sekvenciranja s sintezo (SBS). Kemija SBS uporablja metodo reverzibilnega terminatorja za zaznavanje posameznih fluorescenčno označenih deoksinukleotidnih trifosfatnih baz (dNTP), ko se vgrajujejo v rastoče verige DNK. Med vsakim ciklom sekvenciranja se v verigo nukleinske kisline doda en dNTP. Oznaka dNTP služi kot terminator za polimerizacijo. Po vsaki vgradnji dNTP se fluorescentno barvilo slika, da se identificira baza, nato pa se odcepi, da se omogoči vgradnja naslednjega nukleotida. Štirje na reverzibilni terminator vezani dNTP (A, G, T in C) so prisotni kot posamezne, ločene molekule. Naravna konkurenca zmanjšuje pristranskost vgrajevanja. Med primarno analizo se baze določajo neposredno iz meritev intenzivnosti signala med vsakim ciklom sekvenciranja, kar ima za posledico sekvenciranje po bazah. Vsaki določitvi baze se dodeli ocena kakovosti.
- **Sekundarna analiza** – Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo je na instrumentu NextSeq 550Dx kot del programske opreme Local Run Manager za nastavitve izvedbe testa TSO Comprehensive (EU) in za izvajanje sekundarne analize rezultatov sekvenciranja. Sekundarna analiza vključuje validacijo obdelave izvedbe in kontrolo kakovosti, čemur sledijo demultipleksiranje, ustvarjanje datotek FASTQ, poravnava in določanje variant. Demultipleksiranje ločuje podatke iz združenih knjižnic na podlagi enoličnih indeksov zaporedja, ki so bili dodani med postopkom priprave knjižnice. Ustvarijo so vmesne datoteke FASTQ, ki vsebujejo odčitke sekvenciranja za vsak vzorec in oceno kakovosti, razen za odčitke iz gruč, ki niso prešle filtra. Odčitki sekvenciranja se nato poravnajo z referenčnim genomom, da se ugotovi razmerje med zaporedji in se dodeli ocena na podlagi območij podobnosti. Poravnani odčitki so zapisani v datoteke v formatu BAM. Programska oprema testa uporablja ločene algoritme za knjižnice,

ustvarjene iz vzorcev DNK in/ali RNK, za določitev majhnih variant DNK, pomnožitve genov, TMB in MSI za vzorce DNK ter fuzij in spojitvenih variant za vzorce RNK. Modul programske opreme za analizo ustvari več izhodov, vključno z metrikami sekvenciranja in datotekami v formatu določitev variant (VCF). Datoteke VCF vsebujejo informacije o variantah, najdenih na določenih položajih v referenčnem genomu. Za vsak vzorec se ustvarijo metrike sekvenciranja in posamezne izhodne datoteke. Za podrobnosti o sekundarni in terciarni analizi glejte *Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661)*.

- **Terciarna analiza** – Terciarna analiza, ki jo izvaja Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo, je sestavljena iz izračunov TMB in MSI, določitev za spremljevalno diagnostiko, tumorskega profiliranja variant v dve ravni klinične pomembnosti z uporabo zbirke znanja (KB) in vrste tkiva ter ustvarjanja poročil o rezultatih. Tumorsko profiliranje se lahko imenuje tudi celovito genomsko profiliranje. Interpretirani rezultati variant in rezultati bioloških označevalcev TMB in MSI so povzeti v poročilu o rezultatih testa TSO Comprehensive (EU).

Omejitve postopka

Samo za *in vitro* diagnostično uporabo.

- Samo za uporabo z izdajo na recept. Test se mora uporabiti v skladu s predpisi za klinični laboratorij.
- Genomske ugotovitve, navedene v [Preglednica 2](#) za predvideno uporabo, niso odločilne ali zavezujoče za označeno uporabo katerega koli specifičnega terapevtskega izdelka.
- Za variante, navedene v poročilu o rezultatih testa TSO Comprehensive (EU) v razdelku Genomske ugotovitve z dokazi o klinični pomembnosti (raven 2) in Genomske ugotovitve s potencialno klinično pomembnostjo (raven 3), klinična validacija ni bila izvedena.
- Odločitve o oskrbi in zdravljenju bolnikov morajo temeljiti na neodvisni medicinski presoji lečečega zdravnika, pri čemer je treba upoštevati vse ustrezne informacije o bolnikovem stanju, kot so bolnikova in družinska anamneza, telesni pregledi, podatki iz drugih diagnostičnih testov in bolnikove želje, v skladu s standardom oskrbe v določeni skupnosti.
- Kakovost vzorca FFPE je zelo spremenljiva. Vzorci, ki niso bili podvrženi standardnim postopkom fiksacije, morda ne bodo ustvarili ekstrahiranih nukleinskih kislin, ki izpolnjujejo zahteve za kontrolo kakovosti testa ([Kontrola kakovosti na strani 79](#)). Bloki FFPE, ki so bili shranjeni dlje kot pet let, so pokazali manjšo veljavnost.
- Učinkovitost testa TSO Comprehensive (EU) pri vzorcih, pridobljenih pri bolnikih, ki so imeli presaditev organov ali tkiv, ni bila ocenjena.
- Velike količine nekrotičnega tkiva ($\geq 23\%$) lahko ovirajo sposobnost testa TSO Comprehensive (EU) za odkrivanje pomnožitve genov in fuzije RNK.
- Zaznavanje somatskih vodilnih mutacij je lahko nezanesljivo, če je vsebnost tumorja (glede na površino) manjša od 20 %.
- Izid mikrosatelitno stabilen (MS-stabilen) je lahko nezanesljiv, če je vsebnost tumorja manjša od 30 %. Izid mikrosatelitno velik (MSI-velik) je pravilen ne glede na vsebnost tumorja.

- Hemoglobin, povezan s tkivom, zmanjša podporne odčitke za spojitvene variante ME.
- V zelo preurejenih genomih z delecijami in izgubo heterozigotnosti lahko programska oprema TSO Comprehensive (EU) napačno razvrsti vzorec DNK kot kontaminiran (CONTAMINATION_SCORE > 3106 in p-vrednost > 0,049).
- Negativni rezultat ne izključuje prisotnosti mutacije pod mejami zaznavnosti (LoD) testa.
- Na občutljivost za zaznavanje majhnih variant DNK lahko vplivajo:
 - Majhna kompleksnost genomskega konteksta.
 - Povečanje dolžine variante.
- Ocene TMB so lahko netočne v naslednjih kontekstih:
 - Ko vsebnost tumorja doseže ravni, pri katerih se frekvence alelov zarodnih in somatskih variant (VAF) zblížajo.
 - V populacijah, ki niso dobro zastopane v javnih zbirkah podatkov.
- Pomnožitev gena je edina varianta števila kopij, o kateri poroča TSO Comprehensive (EU). Test ne poroča o delecijah gena.
- Algoritmi za določanje fuzije v programski opremi testa TSO Comprehensive (EU) morda ne upoštevajo dokazov iz odčitkov, ki segajo zunaj označenih meja gena.
- Na občutljivost za zaznavanje fuzij lahko vpliva:
 - Majhna kompleksnost knjižnice, kar ima za posledico manj podpornih odčitkov zaradi odstopanj v poteku dela testa (na primer upoštevajte korake mešanja v [Denaturacija in prileganje RNK na strani 43](#)).
 - Ko en sam gen obsega obe prelomni točki.
 - Ko je več prelomnih točk fuzij v neposredni bližini druga druge z enim ali več partnerji, se lahko več prelomnih točk in partnerjev poroča kot ena sama prelomna točka in partner.
 - Majhna mediana velikosti insercij. Potrebna je najmanjša mediana velikosti insercije 80 bp, občutljivost pa se zmanjša v razponu 80–100 bp.
 - Majhna kompleksnost zaporedja ali homologni genomski kontekst okoli fuzijskih prelomnih točk.
- Ločljivost genov, vključenih v fuzijo, je lahko prizadeta, če se prelomne točke fuzije pojavijo v genomskih regijah, ki vsebujejo prekrivajoče se gene. Če več genov prekriva prelomno točko, bo test poročal o vseh genih, ločenih s podpičji.
- Nedosledna pokritost v regiji promotorja TERT lahko zaradi majhne globine povzroči odsotnost rezultata.
- Napake v označevanju ali zbirku znanja lahko povzročijo lažno pozitiven ali lažno negativen rezultat, vključno z navedbo variante na napačni ravni (med genomskimi ugotovitvami z dokazi klinične pomembnosti [raven 2] in genomskimi ugotovitvami s potencialno klinično pomembnostjo [raven 3]), ali pa so lahko podatki označevanja v poročilu napačni. Napake v označevanju ali KB ne vplivajo na variante, ki so navedene v rezultatih CDx. Možnost napake obstaja zaradi naslednjih treh virov:
 - Označevanje variante s testom TSO Comprehensive (EU) Na podlagi analize 2.448.350 variant COSMIC v92 je delež napak približno 0,0027 %, zato obstaja majhna možnost napake.
 - Napaka KB zaradi postopka zdravljenja.

- Relevantnost vsebine KB se s časom spreminja. Poročilo odraža znanje v času priprave različice zbirke znanja.
- TSO Comprehensive (EU) je zasnovan tako, da poroča o somatskih variantah pri poročanju o variantah z dokazi o klinični pomembnosti oziroma variantah z morebitno klinično pomembnostjo. Ker gre za test, ki zajema samo tumorje, je poročanje o variantah zarodne linije (podedovanih) mogoče, vendar nenamerno. Test TSO Comprehensive (EU) uporablja zbirko znanja za poročanje o variantah brez izrecnega označevanja, če so zarodnega ali somatskega izvora.
- KB vključuje le terapevtske, diagnostične in prognostične povezave, ki so relevantne za variante, prisotne v ugotovljeni solidni maligni novotvorbi. Povezave z občutljivostjo ali tveganjem za rak niso vključena v KB.
- Naslednja preglednica prikazuje spremembe nukleotida za tri variante RET, ki jih test ne more zaznati. Zazna lahko druge spremembe nukleotida za isto spremembo aminokisline.

Preglednica 3 Spremembe nukleotida za tri variante RET

Sprememba aminokisline	Chr*	Položaj	Referenčni alel	Alternativna možnost
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

* Chr = kromosom

Komponente izdelka

Test TSO Comprehensive (EU) vključuje naslednje komponente:

- Komplet TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illuminakatalogska št. 20063092) – komplet vključuje reagente z zadostno količino za ustvarjanje 24 knjižnic DNK in 24 knjižnic RNK.. Ta količina vključuje vzorce bolnikov in kontrole. Kontrole se prodajajo ločeno (glejte [Potrebni reagenti, ki niso priloženi na strani 16](#)).
- Baza znanja: Redno posodobljena in na voljo za prenos na portalu Lighthouse Illumina.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (Illumina katal.št. 20051843), ki vključuje naslednje komponente:
 - Paketi zahtevkov TSO Comprehensive

- Paket programske opreme TSO Comprehensive
- Komplet USB TSO Comprehensive

Servisni predstavnik družbe Illumina namesti ustrezno različico Modul za analizo TSO Comprehensive (EU) na Local Run Manager Instrument NextSeq 550Dx. Za informacije o modulu za analizo glejte Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661).

Reagenti

Priloženi reagenti

Kompletu so priloženi naslednji reagenti TSO Comprehensive (EU).

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, št. dela 20031127

Reagent	Številka dela	Količina	Volumen	Učinkovine	Temperatura shranjevanja
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli in nukleotide	od –25 °C do –15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje DNA polymerase, RNazo H in nukleotide	od –25 °C do –15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli in naključne heksamere	od –25 °C do –15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje reverse transcriptase	od –25 °C do –15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznjen), PN 20031118

Reagent	Številka dela	Količina	Volumen	Učinkovine	Temperatura shranjevanja
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje DNA polymerase T4 in polinukleotidno kinazo	od -25 °C do -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli in nukleotide	od -25 °C do -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli	od -25 °C do -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje ligazo	od -25 °C do -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje univerzalne oligonukleotide za sekvenciranje	od -25 °C do -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje univerzalne oligonukleotide za sekvenciranje	od -25 °C do -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli	od -25 °C do -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje DNA polymerase in nukleotide	od -25 °C do -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (hlajen) (št. dela 20031119)

Reagent	Številka dela	Količina	Volumen	Učinkovine	Temperatura shranjevanja
Pufer za resuspendiranje (RSB, Resuspension Buffer)	20031444	1	12,4 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli	od 2 °C do 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodna raztopina, ki vsebuje magnetne kroglice	od 2 °C do 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Raztopina Tris EDTA	od 2 °C do 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, št. dela 20031120

Učinkovine: Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje s črtno kodo posamezno označene začetne oligonukleotide.

**POZOR**

Za vzorce RNK ali DNK uporabite enolične indeksne začetne oligonukleotide (Unique Index Primers – UPxx). V isti knjižnici sočasno ne kombinirajte indeksnih začetnih oligonukleotidov CPxx in UPxx.

Indeksni začetni oligonukleotid	Številka dela	Količina	Volumen	Indeks i7	Zaporedje i7	Indeks i5	Zaporedje i5	Temperatura shranjevanja
UP01	20031445	1	24 µl	D702	TCCGGAGA	D503	AGGATAGG	od -25 °C do -15 °C
UP02	20031446	1	24 µl	D707	CTGAAGCT	D504	TCAGAGCC	od -25 °C do -15 °C
UP03	20031447	1	24 µl	D717	CGTAGCTC	D509	KATACCGAA	od -25 °C do -15 °C
UP04	20031448	1	24 µl	D706	GAATTCGT	D510	TTATGAGT	od -25 °C do -15 °C
UP05	20031449	1	24 µl	D712	AGCGATAG	D513	ACGAATAA	od -25 °C do -15 °C
UP06	20031450	1	24 µl	D724	GCGATTAA	D515	GATCTGCT	od -25 °C do -15 °C
UP07	20031451	1	24 µl	D705	ATTCAGAA	D501	AGGCTATA	od -25 °C do -15 °C
UP08	20031452	1	24 µl	D713	GAATAATC	D502	GCCTAT	od -25 °C do -15 °C
UP09	20031453	1	24 µl	D715	TTAATCAG	D505	CTTCGCCT	od -25 °C do -15 °C
UP10	20031454	1	24 µl	D703	CGCTCATT	D506	TAAGATTA	od -25 °C do -15 °C
UP11	20031455	1	24 µl	D710	TCCGCGAA	D517	AGTAAGTA	od -25 °C do -15 °C
UP12	20031456	1	24 µl	D701	ATTACTCG	D518	DEJAVNOST	od -25 °C do -15 °C
UP13	20031457	1	24 µl	D716	ACTGCTTA	D511	AGAGGCGC	od -25 °C do -15 °C
UP14	20031458	1	24 µl	D714	ATGCGCT	D512	TAGCCGCG	od -25 °C do -15 °C
UP15	20031459	1	24 µl	D718	GCCTCT	D514	TTCGTAGG	od -25 °C do -15 °C
UP16	20031460	1	24 µl	D719	GCCGTAGG	D516	CGCTCCGC	od -25 °C do -15 °C

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, kat. št. 20031126

Učinkovine: Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje s črtno kodo posamezno označene začetne oligonukleotide.

**POZOR**

Kombinatorične indeksne začetne oligonukleotide (CPxx) uporabljajte samo za vzorce DNK. V isti knjižnici sočasno ne kombinirajte indeksnih začetnih oligonukleotidov CPxx in UPxx.

Indeksni začetni oligonukleotid	Številka dela	Količina	Volumen	Indeks i7	Sekvenca	Indeks i5	Sekvenca	Temperatura shranjevanja
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	od -25 °C do -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	od -25 °C do -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	od -25 °C do -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	od -25 °C do -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	od -25 °C do -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	od -25 °C do -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	od -25 °C do -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	od -25 °C do -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	od -25 °C do -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	od -25 °C do -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	od -25 °C do -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	od -25 °C do -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	od -25 °C do -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	od -25 °C do -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	od -25 °C do -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	od -25 °C do -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (hlajen), št. dela 20031123

Reagent	Številka dela	Količina	Volumen	Učinkovine	Temperatura shranjevanja
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje formamid in soli	od 2 °C do 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli in trdne paramagnetne kroglice, ki so kovalentno prevlečene s streptavidinom	od 2 °C do 8 °C

Reagent	Številka dela	Količina	Volumen	Učinkovine	Temperatura shranjevanja
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Raztopina natrijevega hidroksida	od 2 °C do 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Pufrana vodna raztopina.	od 2 °C do 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje paramagnetne kroglice v trdni fazi	od 2 °C do 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNBW1)	20031482	2	4,8 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli, 2-merkaptometanol in formamid	od 2 °C do 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli	od 2 °C do 8 °C
Pufer za resuspendiranje (RSB, Resuspension Buffer)	20031444	1	12,4 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli	od 2 °C do 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodna raztopina, ki vsebuje magnetne kroglice	od 2 °C do 8 °C

Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznjen) (št. dela 20031121)

Reagent	Številka dela	Količina	Volumen	Učinkovine	Temperatura shranjevanja
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje oligonukleotide	od -25 °C do -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli	od -25 °C do -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje detergent	od -25 °C do -15 °C

Reagent	Številka dela	Količina	Volumen	Učinkovine	Temperatura shranjevanja
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje DNA polymerase in nukleotide	od –25 °C do –15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje začetne oligonukleotide P5 in P7	od –25 °C do –15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje soli, 2-merkaptotanol in formamid	od –25 °C do –15 °C
PhiX Internal Control (PX3 ali PhiX)	20031492	1	10 µl	Pufrana vodna raztopina, ki vsebuje PhiX za genomsko DNK	od –25 °C do –15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, št. dela 20031122

Reagent	Številka dela	Količina	Volumen	Učinkovine	Temperatura shranjevanja
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Zbirek oligonukleotidnih sond	od –25 °C do –15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Zbirek oligonukleotidnih sond	od –25 °C do –15 °C

Potrební reagenti, ki niso priloženi

Reagenti pred pomnoževanjem

- DNA and RNA extraction and purification reagents – za zahteve glede reagenta glejte [Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27](#).
- DNA and RNA quantification reagents – za zahteve glede reagenta glejte [Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27](#).
- Kontrole TruSight Oncology:
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina katal. št. 20065041)
 - TruSight Oncology RNA Control (Illumina katal. št. 20065042)

- 100-odstotni etanol (EtOH) (200 proof), laboratorijske kakovosti za molekularno biologijo
- RNase/DNase-free water

Reagenti po pomnoževanju

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) (Illumina katal. št. 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 ciklov)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklov)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 ciklov)
- 100-odstotni EtOH (200 proof), laboratorijske kakovosti za molekularno biologijo
- RNase/DNase-free water

Shranjevanje reagentov in ravnanje z njimi

Naslednje škatle reagentov se pošiljajo zamrznjene. Shranjujte pri temperaturi od –25 °C do –15 °C.

Škatla	Številka dela	Območje laboratorija
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pred pomnoževanjem
TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznite)	20031118	Pred pomnoževanjem
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pred pomnoževanjem
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pred pomnoževanjem
TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznite)	20031121	Po pomnoževanju
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Po pomnoževanju



POZOR

Reagentov ne shranjujte v shranjevalni enoti brez ledu ali v predalih na vratih hladilnika.

Naslednja pakiranja reagentov se pošiljajo na blazinicah z gelom za vzdrževanje temperature od 0 °C do 10 °C. Shranjujte pri temperaturi od 2 °C do 8 °C.

Škatla	Številka dela	Območje laboratorija
TruSight Oncology Comp Library Prep (shranjujte v hladilniku)	20031119	Pred pomnoževanjem
TruSight Oncology Comp Enrichment (shranjujte v hladilniku)	20031123	Po pomnoževanju

**POZOR**

Ne zamrzujte reagentov, ki vsebujejo kroglice (LNB1, SPB in SMB).

- Spremembe fizičnega izgleda reagentov lahko kažejo na kvar materialov. Če pride do sprememb fizičnega izgleda (npr. spremembe barve reagenta ali motnost), reagentov ne uporabljajte.
- FSM, SSM, ERA1-B in TCB1 imajo lahko delce, povezane z izdelkom. Pri vsakem reagentu upoštevajte posebne smernice za ravnanje. Po izvedbi korakov mešanja FSM in SSM preostali beli delci, povezani z izdelkom, ne bodo vplivali na učinkovitost.
- Ocenili so stabilnost testa TSO Comprehensive (EU) in dokazali njegovo učinkovitost za do štiri uporabe kompleta. Reagenti so stabilni, če so shranjeni pri navedenih temperaturah do navedenega roka uporabnosti na etiketi škatle.

Oprema in materiali

Potrebna oprema in materiali, ki niso priloženi

Oprema in materiali za postopke pred pomnoževanjem

Oprema	Dobavitelj
Ultrazvočna naprava s pripadajočimi dodatki Glejte Nastavitve konfiguracije ultrazvočne naprave za fragmentacijo DNK na strani 22 .	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Ciklični termostat z naslednjimi specifikacijami: - Ogrevan pokrov z možnostjo nastavitve na 30 °C in 100 °C (ali izklopljen, če ni možna nastavitev na 30 °C) - Zajema temperaturni razpon od 4 °C do 99 °C - Natančnost temperature ± 0,25 °C - Združljivo s ploščami PCR s 96 vdolbinicami, 0,2 ml - Oglejte si Hitrost naraščanja temperature cikličnega termostata na strani 25	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme

Oprema	Dobavitelj
Vibracijski mešalnik	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Inkubatorja za mikrovzorke (2) z vstavki za plošče MIDI s 96 vdolbinicami (2)	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Mikrocentrifuga	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Centrifuga za plošče z naslednjimi specifikacijami: • Združljivo z mikroploščami s 96 vdolbinicami • Zmogljivost: 280 × g (+/- 10 %)	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Stresalna plošča z naslednjimi specifikacijami: • 2-milimetrska orbita • Lahko stresa pri 1200 vrt./min in 1800 vrt./min.	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Tesnilna zagozda ali valjček	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Magnetno stojalo z naslednjimi specifikacijami: • Zasnovan za obarjanje/ločevanje paramagnetnih kroglic • Magneti na strani stojala (ne na dnu) • Združljivo s 96-kanalnimi MIDI-ploščami	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Natančne pipete, ki lahko natančno odmerjajo količine med 2 µl in 1000 µl z naslednjimi specifikacijami: • Enokanalna ali večkanalna pipeta s prirastkom 0,02 µl • Enokanalna ali večkanalna pipeta s prirastkom 0,1 µl, 0,2 µl ali 0,5 µl • Enokanalna ali večkanalna pipeta s prirastkom 1 µl ali 2 µl Pipete morajo biti redno kalibrirane in točne v okviru 5 % navedene prostornine.	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Pipetor	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Ledeni ali hladilni bloki	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
10-mililitrske serološke pipete	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Samolepilne folije za 96-kanalne plošče z naslednjimi specifikacijami: • Odstranljive • Primerne za PCR plošče z obrobo ali polobrobo • Močno lepilo, ki prenese več temperaturnih sprememb od -20 °C do 100 °C • Brez DNaze/RNaze	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme

Oprema	Dobavitelj
Mikrocentrifugirke s prostornino 1,7 ml, brez nukleaze	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Rezervoarji za reagent brez nukleaze (korito za enkratno uporabo, 50 ml) (ali enakovredno)	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
15-mililitrske stožčaste epruvete	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
50-mililitrske stožčaste epruvete	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Združljive konice pipet, odporne proti aerosolu	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Plošče za shranjevanje s 96 vdolbinicami, 0,8 ml (plošče MIDI)	Fisher Scientific, št. dela AB-0859 ali enakovredno
Plošče PCR s 96 vdolbinicami, združljive s cikličnim termostatom, 0,2 ml (polipropilenske vdolbinice)	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme

Oprema in materiali za postopke po pomnoževanju

Oprema	Dobavitelj
Instrument NextSeq 550Dx	Illumina, katalogska št. 20005715
Centrifuga za plošče z naslednjimi specifikacijami: - Združljivo z mikroploščami MIDI s 96 vdolbinicami - Zmogljivost: 280 × g (+/- 10 %)	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Ciklični termostat z naslednjimi specifikacijami: - Ogrevan pokrov (100 °C) - Zajema temperaturni razpon od 4 °C do 99 °C - Natančnost temperature ± 0,25 °C - Združljivo s ploščami PCR s 96 vdolbinicami, 0,2 ml - Oglejte si Hitrost naraščanja temperature cikličnega termostata na strani 25	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Vibracijski mešalnik	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Inkubator za mikrovzorke, z vstavkom za plošče MIDI s 96 vdolbinicami	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme

Oprema	Dobavitelj
Blok za suho segrevanje z naslednjimi specifikacijami: • Temperaturno območje od 25 °C do 99 °C • Natančnost temperature ± 5 °C • Prepričajte se, da so mikrocentrifugirke združljive s toplotnim blokom	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Stresalna plošča z naslednjimi specifikacijami: • Orbita 2 mm • Lahko se stresa pri 1200 vrt./min in 1800 vrt./min.	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Mikrocentrifuga	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Tesnilna zagozda ali valjček	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Magnetno stojalo z naslednjimi specifikacijami: • Zasnovan za obarjanje/ločevanje paramagnetnih kroglic • Magneti na strani stojala (ne na dnu) • Združljivo s 96-kanalnimi MIDI-ploščami	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Natančne pipete, ki lahko natančno dovajajo količine med 2 μ l in 1000 μ l z naslednjimi specifikacijami: • Enokanalna ali večkanalna pipeta s prirastkom 0,02 μl • Enokanalna ali večkanalna pipeta s prirastkom 0,1 μl, 0,2 μl ali 0,5 μl • Enokanalna ali večkanalna pipeta s prirastkom 1 μl ali 2 μl Pipete morajo biti redno kalibrirane in točne v okviru 5 % navedene prostornine.	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Pipetor	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
10-mililitrske serološke pipete	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Samolepilne folije za 96-kanalne plošče z naslednjimi specifikacijami: • Odstranljive • Primerne za PCR plošče z obrobo ali polobrobo • Močno lepilo, ki prenese več temperaturnih sprememb od -20 °C do 100 °C • Brez DNaze/RNaze	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Mikrocentrifugirke s prostornino 2 ml, brez nukleaze	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Mikrocentrifugirke s prostornino 1,7 ml, brez nukleaze	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme

Oprema	Dobavitelj
Rezervoarji za reagent brez nukleaze (korito za enkratno uporabo, 50 ml) (ali enakovredno)	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
15-mililitrske stožčaste epruvete	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
50-mililitrske stožčaste epruvete	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Združljive konice pipet, odporne proti aerosolu	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Plošče za shranjevanje s 96 vdolbinicami, 0,8 ml (plošče MIDI)	Fisher Scientific, št. dela AB-0859 ali enakovredno
Plošče PCR s 96 vdolbinicami, združljive s cikličnim termostatom, 0,2 ml (polipropilenske vdolbinice)	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme
Ledeni ali hladilni bloki	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme

Nastavitve konfiguracije ultrazvočne naprave za fragmentacijo DNK

Fragmentacija DNK ali striženje vpliva na učinkovitost testa z določanjem porazdelitve velikosti fragmenta, kar vpliva na pokritost sekvenciranja. Za test TSO Comprehensive (EU) je bilo ocenjenih in optimiziranih več konfiguracij fokusirane ultrasonikacije ([Preglednica 4](#)).

- Čas striženja je bil prilagojen temu, da bi povečali metriko MEDIAN_EXON_COVERAGE, opisano v [Kontrola kakovosti na strani 79](#). Časi striženja (glejte [Preglednica 4](#)) in rezultati MEDIAN_INSERT_SIZE so se razlikovali med konfiguracijami.
- Konfiguracije 1–4 in 6 so bile testirane z 8 povezanimi steklenimi epruvetami Konfiguracija 5 je uporabila posamezno stekleno epruveto. Prostornine epruvet so prikazane v [Preglednica 4](#).
- Optimizacija konfiguracij 3–6 (manjše količine vodne kopeli) z uporabo pulziranja.
- Konfiguracije od 3–5 so bile strižene v manjših epruvetah. Prostornina epruvete vpliva na parametre striženja.
- Konfiguracija 4 (linijski pretvornik, srednje velik volumen vodne kopeli, razplinjena voda) je zahtevala dolg čas zakasnitve impulza (40 sekund), da bi dosegli podoben MEDIAN_EXON_COVERAGE kot konfiguracija 1 in 2 pri nazivnem vходу 40 ng.
- Optimalne nastavitve za konfiguracijo 3 so povzročile nekoliko večjo porazdelitev velikosti fragmentov v primerjavi z drugimi konfiguracijami (MEDIAN_INSERT_SIZE je bil približno 5–10 baznih parov večji).
- Konfiguraciji 3 in 5 sta uporabljali ne-razplinjeno vodo in najmanjši volumen vodne kopeli.

- Konfiguraciji 3 in 5 sta potrebovali povečan vnos DNK (50 ng za konfiguracijo 3, 60 ng za konfiguracijo 5), da bi dosegli podobno MEDIAN_EXON_COVERAGE glede na druge 4 konfiguracije, ki so uporabljale nazivni vhod 40 ng.
- Konfiguraciji 3 in 5 imata več poškodb in/ali denaturacije in zato zmanjšano učinkovito maso uporabnih molekul dsDNA za pripravo knjižnice.

Med postopkom pridobivanja centrifugirajte strižne cevi, da zagotovite, da je pridobljen predpisani volumen, saj lahko vsaka izguba materiala negativno vpliva na delovanje.

Preglednica 4 Ocenjene konfiguracije fokusirane ultrazvočne naprave

Parameter	Konfiguracija					
	1	2	3	4	5	6
Pretvornik	Linija	Točka	Točka	Linija	Točka	Linija
Prostornina vodne kopeli	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Razplinjena voda	Da	Da	Ne	Da	Ne	Da
Ohlajevalnik vode	Da	Da	Da	Da	Da	Da
Temperatura vodne kopeli	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Največja vhodna moč (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% delovnega cikla	30	10	30	25	20	25
Št. ciklov na sunek	200	200	1000	1000	1000	600
Pulziranje (10-sekundni sunki)	Ne	Ne	Da	Da	Da	Da
Časovni zamik med pulzi	Ni na voljo	Ni na voljo	10 s	40 s	10 s	10 s
Čas striženja	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Obdelava vzorca	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Velikost serije	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Velikost vzorca v 8 povezanih eprugetah	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Posamezna epruveta (50 µl)	130 µl (ali pladenj s 96 mikroeprugetami)
Drgetanje (dithering)	Ni na voljo	Ni na voljo	Ni na voljo	3 mm Y pri 20 mm/s	Ni na voljo	1,5 mm Y pri 10 mm/s
Ekvivalent vnosa DNK (za mediano pokritost eksona)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Čas striženja 200 sekund je sestavljen iz 10-sekundnih sunkov z 20 ponovitvami.² Čas striženja 320 sekund je sestavljen iz 10-sekundnih sunkov z 32 ponovitvami.

Hitrost naraščanja temperature cikličnega termostata

Hitrost naraščanja temperature cikličnega termostata vpliva na metriko testa KK (uporabna mesta MSI, mediana števila binov za CNV-tarčo, mediana velikosti vložka (RNK)) in podporne odčitke za spojitvene variante in fuzije. Priporoča se optimizacija hitrosti naraščanja temperature cikličnega termostata. Na primer, testiran model je bil prilagojen od privzete (in največje) hitrosti naraščanja 5 °C/s na 3 °C/s, da bi dobili primerljive rezultate z drugimi modeli z manjšimi privzetimi hitrostmi naraščanja temperature.

Zbiranje, transport in shranjevanje vzorcev

Pri odvzemu, prevozu, shranjevanju in obdelavi vzorcev upoštevajte standardne postopke.

Zahteve glede vzorca

Tkivo FFPE

Test TSO Comprehensive (EU) zahteva 40 ng RNK in/ali 40 ng DNK, ekstrahirane iz tkiva FFPE. Uporaba RNK in DNK omogoča analizo vseh zahtevanih vrst variant. Tkivo je treba fiksirati s formalinom, primernim za molekularne analize (na primer 10-odstotni nevtralnno pufran formalin). Tkiva se ne sme dekalificirati. Pred izvajanjem testa TSO Comprehensive (EU) mora patolog pregledati vzorec tkiva, da se prepriča, ali je primeren za ta test. Za odkrivanje somatskih gonilnih mutacij je potrebnih najmanj 20 % vsebnosti tumorja (glede na območje). Zanesljivo odkrivanje stanja MSI v različnih vzorcih zahteva najmanj 30 % vsebnosti tumorja. Če se vzorec testira z manj kot 30 % vsebnostjo tumorja za določitev izidov z drugimi vrstami variant, je lahko rezultat MS-stabilen nezanesljiv. MSI-visok rezultat je pravilen ne glede na vsebnost tumorja.

Vsebnost tumorja za pomnožitev gena in variante RNK je odvisna od obsega pomnožitve ali fuzijske ekspresije (glejte [Vsebinska tumorja na strani 101](#)).

Za veliko verjetnost ekstrakcije 40 ng RNK in 40 ng DNK iz različnih vrst čvrstih tkiv je priporočena količina tkiva $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Ta količina je enakovredna kumulativni površini vitalnega tkiva $\geq 200 \text{ mm}^2$ pri uporabi rezin debeline $5 \mu\text{m}$ ali $\geq 100 \text{ mm}^2$ pri uporabi rezin debeline $10 \mu\text{m}$. Kumulativna površina tkiva je vsota površine vitalnega tkiva v vseh odsekih, predloženih za ekstrakcijo. Na primer, kumulativno površino tkiva 200 mm^2 lahko dobimo z ekstrakcijo štirih rezin debeline $5 \mu\text{m}$ s površino tkiva 50 mm^2 ali petih rezin z debelino $10 \mu\text{m}$ s površino tkiva 20 mm^2 . Nekroza tkiva lahko zmanjša količino donosa nukleinske kisline. Za zmanjšanje možnosti lažno negativnih rezultatov se lahko tkivo makrodisecira, da se doseže želen delež vitalnega tumorskega tkiva.

Visoke količine nekrotičnega tkiva ($\geq 23 \%$ po površini) lahko ovirajo sposobnost testa TSO Comprehensive (EU) za odkrivanje pomnožitve genov in fuzije RNK. Če odseki vzorca vsebujejo več kot 23-odstotno nekrozo v celotni površini tkiva, je treba nekrotično tkivo makrodiseksirati. Če laboratorij analizira RNK s testom, se je treba pri pridobivanju rezin iz tkivnega bloka izogibati ali zmanjšati tkivo s hemoglobinom. Oglejte si [Moteče snovi na strani 92](#).

Tkivo FFPE, pritrjeno na stekelca, lahko shranjujete do 28 dni pri sobni temperaturi.

Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin

- Ekstrahirajte RNK in DNK iz vzorcev tkiva FFPE z uporabo komercialno dostopnih kompletov za ekstrakcijo. Razlike v kompletih za ekstrakcijo lahko vplivajo na učinkovitost. Glejte [Ocena kompleta za ekstrakcijo nukleinske kisline na strani 91](#).
- Med ekstrakcijo ne povečujte koncentracije proteinaze K ali enakovrednega encima nad standardno koncentracijo v kompletu za ekstrakcijo. Oglejte si [Moteče snovi na strani 92](#).
- Ekstrahirano zalogo nukleinske kisline shranite v skladu z navodili proizvajalca kompleta za ekstrakcijo.
- Ekstrahirano DNK hranite do 28 dni pri -25°C do -15°C .
- Ekstrahirano RNK hranite do 28 dni pri -85°C do -65°C .
- Da se izognite spremembam koncentracije, do katerih pride sčasoma, izmerite DNK in RNK v 28 dneh od začetka priprave knjižnice. Kvantificirajte RNK in DNK z uporabo fluorimetrične kvantifikacijske metode, ki uporablja barvila za vezavo nukleinske kisline. Koncentracija nukleinske kisline mora biti povprečje vsaj treh meritev.
- Test zahteva 40 ng vsakega vzorca RNK, pripravljenega v vodi RNase/DNase-free water (ni priložena), kar pomeni končno količino 8,5 μl (4,7 ng/ μl).
- Test zahteva 40 ng vsakega vzorca gDNK z najmanjšo koncentracijo ekstrakcije 3,33 ng/ μl . Razgrajevanje zahteva končno količino 52 μl (0,77 ng/ μl) z najmanj 40 μl TEB (priloženo), ki se uporablja kot redčilo.

Shranjevanje knjižnic

Knjižnice hranite v ploščah PCR z nizko vezavo 7 do 32 dni, odvisno od vrste knjižnice (glejte [Preglednica 5](#)).

Preglednica 5 Čas shranjevanja knjižnic

Vrsta knjižnice	Plošča	Število dni	Temperatura shranjevanja
cDNA	PCF PCR	≤ 7	od -25°C do -15°C
Fragmentirana gDNK	LP PCR	≤ 7	od -25°C do -15°C
Pred obogatitvijo	ALS PCR	≤ 30	od -25°C do -15°C
Po obogatitvi	PCR ELU2	≤ 7	od -25°C do -15°C
PCR po obogatitvi	PL PCR	≤ 30	od -25°C do -15°C
Normalizirana	NL PCR	≤ 32	od -25°C do -15°C

Opozorila in previdnostni ukrepi

Varnost



OPOZORILO

Ta nabor reagentov vsebuje kemikalije, ki so lahko nevarne. Do telesnih poškodb lahko pride zaradi vdihavanja, zaužitja, stika s kožo in z očmi. Prezračevanje mora biti primerno za ravnanje z nevarnimi snovmi v reagentih. Uporabljajte zaščitno opremo, vključno z zaščito za oči, rokavicami in laboratorijsko haljo, glede na tveganje izpostavljenosti. Uporabljene reagente obravnavajte kot kemične odpadke in jih zavržite v skladu z veljavnimi regijskimi, nacionalnimi in lokalnimi zakoni in uredbami. Za dodatne informacije o varovanju okolja in zdravja ter zagotavljanju varnosti glejte SDS na spletnem mestu support.illumina.com/sds.html.

- Z vsemi vzorci ravnajte, kot da so znano kužni
- Uporabljajte rutinske laboratorijske previdnostne ukrepe. Ne pipetirajte z usti. Ne jejte, pijte ali kadite na določenih delovnih območjih. Pri ravnanju z vzorci in reagenti testa nosite rokavice za enkratno uporabo in laboratorijske plašče. Po ravnanju z vzorci in reagenti testa si temeljito umijte roke.

Laboratorij

- Da preprečite kontaminacijo, uredite laboratorij z enosmernim potekom dela. Območja, namenjena postopkom pred pomnoževanjem, in tista, namenjena postopkom po pomnoževanju, morajo imeti za to namenjeno ločeno opremo in materiale (npr. pipete, pipetne konice, vibracijski mešalnik in centrifugo). Da bi preprečili prenos produktov pomnoževanja ali sond, se po vstopu na območje po pomnoževanju izogibajte vračanju na območje pred pomnoževanjem.
- Izvedite korake indeksne PCR in obogatitve na območju za korake po pomnoževanju, da preprečite prenos produktov pomnoževanja.
- Postopki priprave knjižnice zahtevajo okolje brez-RNaze/DNaze. Temeljito dekontaminirajte delovna območja s čistilom, ki zavira RNazo/DNazo. Uporabljajte plastiko, ki je certificirana kot brez DNaze, RNaze in človeške genomske DNK.
- Za postopke po pomnoževanju temeljito očistite delovne površine in opremo pred vsakim postopkom in po njem s sveže pripravljeno raztopino 0,5-odstotnega natrijevega hipoklorita (NaOCl). Počakajte, da je raztopina v stiku s površinami 10 minut, nato pa temeljito obrišite s 70-odstotnim etilnim ali izopropilnim alkoholom.
- Uporabite mikrocentrifirke, plošče, pipetne konice in rezervoarje brez nukleaze.
- Vseskozi za test uporabljajte kalibrirano opremo. Poskrbite, da opremo kalibirate glede na hitrosti, temperature in količine, navedene v tem protokolu.

- Uporabljajte natančne pipete, ki zagotavljajo natančno dovajanje reagentov in vzorcev. Redno kalibrirajte v skladu s specifikacijami proizvajalca.
- Pri uporabi večkanalnih pipet upoštevajte naslednje smernice:
 - Pipetirajte najmanj $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Prepričajte se, da so konice s pregrado dobro prilegajoče in primerne za blagovno znamko in model večkanalnih pipet.
 - Konice pritrdite s krožnim gibom, da se prepričate, da so vse konice enako dobro pritrjene.
 - Aspirirajte pod kotom 90° z enako količino tekočine pri vseh konicah.
 - Po dovajanju vse komponente premešajte s pipetiranjem reakcijske zmesi gor in dol.
 - Po doziranju se prepričajte, da je tekočina v celoti iztekla iz vsake konice.
- Prepričajte se, da uporabljate opremo, navedeno za test, in nastavite programe po navodilih.
- Navedene temperature za ciklični termostat in za inkubator mikrovzorcev pomenijo temperaturo reakcije, ne nujno na nastavljeno temperaturo opreme.

Test

- Preprečite navzkrižno kontaminacijo.
 - Pri ravnanju z vzorci in reagenti upoštevajte ustrezne laboratorijske prakse.
 - Med posameznimi vzorci in odmerjanjem posameznih reagentov uporabite sveže laboratorijske potrebščine za enkratno uporabo in sveže pipetne konice.
 - Uporabite konice, odporne proti aerosolu, da zmanjšate tveganje navzkrižne kontaminacije.
 - Uporabite enosmerni potek dela, ko se pomikate od območij pred pomnoževanjem do območij po pomnoževanju.
 - Sočasno uporabljajte in odprite samo en indeksni začetni oligonukleotid. Vsako epruveto z indeksom ponovno zaprite takoj po uporabi. V kompletu so na voljo dodatni pokrovčki.
 - Rokavice pogosto menjajte, če pridejo v stik z indeksnimi začetnimi oligonukleotidi ali vzorci.
 - Odstranite neuporabljene epruvete z indeksnimi začetnimi oligonukleotidi z delovne površine.
 - Po uporabi reagenta skupaj s stojalom epruvet, koritom ali z rezervoarjem ga ne vrnite nazaj v izvirne epruvete.
 - Vzorce zmešajte s pipeto in centrifugirajte ploščo, kadar je to indicirano.
 - Uporabite stresalnik mikroplošč. Ne uporabljajte vrtničnega mešalnika.
- Ne zamenjajte komponent iz različnih serij kompletov reagentov. Serije kompletov reagentov so navedene na etiketi na škatli kompleta reagenta in glavnem listu serij.
- Da nukleaze in izdelki za PCR ne bi kontaminirali reagentov, instrumentov, vzorcev in knjižnic, so potrebne ustrezne laboratorijske prakse. Kontaminacija z nukleazo in izdelki za PCR lahko povzroči netočne in nezanesljive rezultate.

- Za optimalno učinkovitost in shranjevanje testa je potrebna ustrezna vrsta plošče. Upoštevati morate navodila za prenos plošč v [Navodila za uporabo na strani 38](#).
- Neupoštevanje opisanih postopkov lahko povzroči napačne rezultate oziroma znatno zmanjša kakovost knjižnice.
- Če v [Navodila za uporabo na strani 38](#) ni navedena točka za varno zaustavitev, takoj nadaljujte z naslednjim korakom.
- Testne reagente oziroma komponente shranjujte pri navedeni temperaturi na temu namenjenih površinah za delo pred-pomnoževanjem in po-pomnoževanju.
- Reagentov ne shranjujte v shranjevalni enoti brez ledu ali v predalih na vratih hladilnika.
- Ne zamrzujte reagentov, ki vsebujejo kroglice (LNB1, SPB in SMB).
- Ne uporabljajte reagentov, ki so bili nepravilno shranjeni.
- Ne odstopajte od postopkov mešanja in ravnanja, navedenih za vsak reagent. Nezadostno mešanje ali prekomerno vrtinčenje reagentov lahko povzroči nepravilne rezultate vzorcev.
- FSM, SSM, ERA1-B in TCB1 imajo lahko delce, povezane z izdelkom. Pri vsakem reagentu upoštevajte smernice za ravnanje. Po izvedbi korakov mešanja FSM in SSM preostali beli delci, povezani z izdelkom, ne bodo vplivali na učinkovitost.
- Pripravite sveže glavne mešanice in po uporabi zavrzite preostalo količino.
- Za korake pranja vedno pripravite svež 80 % etanol z vodo brez RNaze/DNaze RNase/DNase-free water. Etanol lahko absorbira vodo iz zraka, kar bi lahko vplivalo na rezultate. Po uporabi 80 % etanol zavrzite v skladu z lokalnimi, državnimi in/ali zveznimi predpisi.
- Prenesite navedeno količino eluata. Prenos manjše količine eluata med koraki elucije od navedene lahko vpliva na rezultate.
- Za ultrazvočne naprave uporabite naslednje smernice. Upoštevati morate navodila proizvajalca.
 - Počasi napolnite gDNK v epruveto ultrazvočne naprave, da preprečite ustvarjanje mehurčkov. Čezmerni mehurčki ali zračna vrzel v epruveti za razgrajevanje lahko povzročijo nepopolno fragmentacijo.
 - Počasi odmerjajte v epruvete ultrazvočne naprave in se izogibajte brizganju.
 - Da se izognete odstranitvi tekočine in izgubi vzorca, ne vstavite pipetne konice na dno epruvete ultrazvočne naprave, ko odstranjujete fragmentirano DNK.
- Ne pipetirajte manj kot 2 µl vzorca.
- Pri odmerjanju reagentov v korakih, ki zahtevajo manj kot 10 µl materiala na posamezno vzorčno vdolbinico, ne uporabljajte korita.
- Pri prenašanju vzorcev fragmentirane gDNK iz epruvet ultrazvočne naprave na ploščo Library Prep (LP) uporabite pipeto s fino konico.
- Ne kombinirajte adapterjev SUA1 in UMI.
- Adapterje SUA1 uporabite z vzorci RNK.
- Adapterje UMI uporabite z vzorci DNK.

- Vsakemu vzorcu knjižnice dodelite različne indeksne začetne oligonukleotide, da enolično identificirajo vsako knjižnico, ko jo združite za sekvenciranje na eni pretočni celici.
- V isti knjižnici ne kombinirajte indeksnih začetnih oligonukleotidov CPxx in UPxx.
- Neujemanja med vzorci in indeksnimi začetnimi oligonukleotidi povzročijo nepravilno poročanje o rezultatih zaradi izgube pozitivne identifikacije vzorca. Vnesite ID vzorca in dodelite indekse v Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo pred začetkom priprave knjižnice. Med pripravo knjižnice zabeležite ID vzorca, indeksiranje in položaj vdolbinice na plošči za referenco.
- Pri knjižnicah, pridobljenih iz vzorcev RNK, uporabite samo indekse UPxx.
- Pri knjižnicah, pridobljenih iz vzorcev DNK, uporabite indekse UPxx ali indekse CPxx.
- Sekvencirajte največ 8 knjižnic RNK in 8 knjižnic DNK na pretočno celico. Sekvencirajte najmanj tri knjižnice. Upoštevajte smernice v razdelku [Število knjižnic in izbor indeksov na strani 35](#).
- Po koraku vezave v razdelku [Zajem tarč ena na strani 59](#) in [Zajem tarč dve na strani 63](#) takoj nadaljujte s korakom izpiranja, da preprečite sušenje pelet kroglic.
- Med koraki izpiranja z dna vdolbinic odstranite ves 80 % etanol. Pokazali so, da preostali etanol vpliva na rezultate.
- Za optimalno učinkovitost testa upoštevajte določeno število izpiranj, navedenih v [Navodila za uporabo na strani 38](#).
- Med postopkom [Normalizacija knjižnic na strani 70](#) temeljito resuspendirajte peleto kroglic knjižnice library beads, da dosežete konsistentno gostoto gruč na pretočni celici.
- O resnih zapletih, povezanih s tem izdelkom, takoj poročajte družbi Illumina in pristojnim organom držav članic, v katerih prebivata uporabnik in bolnik.

Postopkovne opombe

- Potek dela TSO Comprehensive (EU) je mogoče izvesti po naslednjem urniku:
 - 1. dan: sinteza cDNA iz vzorcev RNK, fragmentacija DNK vzorcev gDNA, priprava knjižnice in začetek (prve) hibridizacije čez noč.
 - 2. dan: Obogatitev, normalizacija obogatenih knjižnic in nalaganje knjižnic na Instrument NextSeq 550Dx.
- Če poteka dela TSO Comprehensive (EU) ni mogoče izvesti v skladu s tem razporedom, je v celotnem protokolu določenih več točk za varno zaustavitev. Če v protokolu ni navedena točka za varno zaustavitev, takoj nadaljujte z naslednjim korakom.
- Knjižnice, pridobljene iz vzorcev RNK in DNK, lahko hkrati pripravite v ločenih vdolbinicah.
- Preglednice za pripravo osnovne (master) mešanice vključujejo presežni volumen, da se zagotovi zadostna količina za obdelavo predvidenega števila vzorcev.
- Uporabite vodo molekularne kakovosti, ki ne vsebuje nukleaz.

- Po dodajanju reagenta sperite konico tako, da enkrat aspirirate in dozirate v ustrezno vdolbinico na ploščici, razen če je v postopku določeno drugače.
- Sobna temperatura je opredeljena kot temperatura od 15 °C do 30 °C.
- Reagenti, vzorci in knjižnice morajo biti v določenih korakih v navodilih za uporabo hranjeni na hladnem. To je opredeljeno kot shranjevanje na ledu ali enakovredno.

Programi cikličnega termostata

- Programirajte programe cikličnega termostata na opremi pred pomnoževanjem in po njem, preden zaženete protokol.
- Prepričajte se, da se plošče PCR tesno prilegajo v ciklični termostat.
- Uporabite plošče, ki jih priporoča proizvajalec cikličnega termostata.

Zatesnitev in odpečatenje plošče

- Plošče vedno zatesnite z novo samolepilno folijo. Folij ne uporabljajte ponovno.
- Da ploščo zatesnite, zanesljivo namestite samolepilno folijo na ploščo s tesnilno zagozdo ali valjčkom.
- Ploščo s 96 vdolbinicami vedno zatesnite z novo samolepilno folijo pred naslednjimi koraki v protokolu.
 - Koraki stresanja plošče
 - Koraki centrifugiranja
 - Koraki termičnega cikliranja
 - Hibridizacija
 - Dolgotrajno skladiščenje
- Prepričajte se, da so robovi in vdolbinice zatesnjeni, da zmanjšate tveganje za navzkrižno kontaminacijo in izhlapevanje.
- Ploščo postavite na ravno površino in z nje počasi odstranite folijo.
- Če pred odpiranjem opazite tekočino ali kondenzacijo na foliji ali stranskih stenah vdolbinic na plošči, 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g.
- Uporabljajte samolepilno folijo, ki je učinkovita pri temperaturah od –20 °C do 100 °C in je primerna za plošče PCR z obrobo ali polobrobo.

Oprema

- Pred začetkom testa se prepričajte, da je laboratorijsko osebje seznanjeno z navodili proizvajalca za uporabo in vzdrževanje vse opreme.

Vrsta plošče in prenosi plošče

- Za optimalno učinkovitost in shranjevanje testa je potrebna ustrezna vrsta plošče.

- Pri prenašanju količin med ploščami prenesite navedeno količino iz vsake vdolbinice na plošči v ustrezno vdolbinico ciljne plošče.
- Pri prenašanju vzorcev med nizi epruvet ali ploščami lahko uporabite večkanalne pipete.
- Pri stresanju plošč upoštevajte naslednje smernice.
 - Za stresanje plošč uporabite stresalno ploščo. Ne uporabljajte vibracijskega mešalnika.
 - Plošče PCR stresajte pri 1200 vrt./min.
 - Plošče MIDI stresajte pri 1800 vrt./min.
 - Upoštevajte navodila proizvajalca, da zagotovite, da je plošča na stresalni plošči zanesljivo nameščena.

Centrifugacija

- Ko navodila v protokolu navajajo, da se centrifuga za kratek čas, centrifugirajte 1 minuto pri $280 \times g$.
- Če opazite tekočino na tesnilu ali na straneh vdolbinice, 1 minuto centrifugirajte ploščo pri $280 \times g$.

Rokovanje z reagenti

- Vse epruvete z reagentom takoj po uporabi tesno zaprite, da omejite izhlapevanje in preprečite kontaminacijo.
- Reagente vrnite na navedeno temperaturo shranjevanja, ko niso več potrebni za postopek.
- Pred vsakim postopkom upoštevajte pripravo reagenta, ki je navedena pred vsakim razdelkom o postopku v [Navodila za uporabo na strani 38](#).
- Poskrbite, da boste za število vzorcev, ki jih nameravate obdelati, pripravili zahtevano količino osnovne mešanice, mešanice za elucijo in 80-odstotnega etanola.
- Količine, navedene v preglednicah za osnovno mešanico in raztopino, vključujejo presežek. Izračuni presežne količine so naslednji.
 - [Preglednica 14](#)
 - Volumen FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{število vzorcev} + \text{kontrol}) \times (1,25)$.
 - Volumen RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{število vzorcev} + \text{kontrol}) \times (1,25)$.
 - [Preglednica 21](#)
 - Volumen ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (1,20)$.
 - Volumen ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (1,20)$.
 - [Preglednica 29](#)
 - Volumen EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (1,364)$.
 - Volumen HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (1,364)$.
 - [Preglednica 30](#)
 - Volumen EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (1,364)$.
 - Volumen HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (1,364)$.

- [Preglednica 36](#)
 - Volumen LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (2,0)$.
 - Volumen LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (2,0)$.
- [Preglednica 37](#)
 - Volumen EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (1,25)$.
 - Prostornina HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{število knjižnic}) \times (1,25)$.

Kompleti adapterjev

- Test TSO Comprehensive (EU) vključuje adapterje SUA1 in UMI.
- Adapterji SUA1 so namenjeni uporabi z vzorci RNK. Niso za uporabo z vzorci DNK.
- Adapterji UMI so namenjeni uporabi z vzorci DNK. Niso za uporabo z vzorci RNK.

Ravnanje s kroglicami

- Test TSO Comprehensive (EU) vsebuje tri vrste kroglic (SPB, SMB in LNB1). Prepričajte se, da med postopkom uporabljate pravilno vrsto kroglic.
- Za vsako vrsto kroglic izvedite ustrezno število pranj.
- Pred uporabo se prepričajte, da so kroglice pri sobni temperaturi.
- Pred uporabo 1 minuto mešajte kroglice, da zagotovite homogenost.
- Pri mešanju kroglic s pipeto upoštevajte naslednje smernice:
 - Uporabite ustrezno pipeto in velikost konice za količino, ki jo mešate.
 - Prilagodite nastavev volumna na približno 50–75 % volumna vzorca.
 - Pipetirajte počasi, ne da bi sprostili bat.
 - Izogibajte se brizganju in uvajanju mehurčkov.
 - Konico pipete namestite nad pelet in jo izpraznite neposredno v pelet, da sprostite kroglice iz vdolbinice ali epruvete.
 - Prepričajte se, da je kroglica v celoti v raztopini. Raztopina mora izgledati temno rjavo in imeti homogeno konsistenco.
 - Ocenite, ali je prisotna kroglica. Previdno aspirirajte celotno raztopino kroglice v vdolbinici v konico in si oglejte dno vdolbinic.
- Če se kroglice med koraki magnetne ločitve aspirirajo v konico pipete, jih na magnetnem stojalu sprostite nazaj na ploščo. Počakajte, da se tekočina zbistri (približno 2 minuti), preden nadaljujete z naslednjim korakom postopka.
- Pri pranju kroglic:
 - Za ploščo uporabite priporočeno magnetno stojalo.
 - Tekočino sprostite neposredno na kroglice, tako da so kroglice na strani vdolbinice mokre.

- Ploščo hranite na magnetnem stojalu, dokler postopek ne zahteva, da jo odstranite.
- Ploščice ne tresite, ko ste na magnetnem stojalu.
- Ko so na magnetnem stojalu, ne premikajte kroglice.
- Ko spirate kroglice ali odstranjujete supernatant, na dnu vdolbinice nagnite konice pipete, da ne ustvarite vakuumu in na povlečete raztopine v filtre konice pipete.

Število knjižnic in izbor indeksov

Pred nastavitvijo izvedbe načrtujte število vzorčnih knjižnic in vzorčnih indeksov za sekvenciranje. Naslednje smernice za število vzorcev vključujejo pozitivne kontrole, vendar izključujejo negativne kontrole/kontrole brez predloge (NTC). NTC je treba dodati načrtovani izvedbi kot dodaten vzorec.

Za TSO Comprehensive (EU) sledite smernicam v [Preglednica 6](#) in [Preglednica 7](#), da določite število knjižnic RNK in/ali DNK za sekvenciranje na eni pretočni celici. Glejte [Preglednica 6](#), če ločeno sekvencirate knjižnice RNK ali DNK. Glejte [Preglednica 7](#), če na isti pretočni celici sekvencirate knjižnice RNK in DNK.

Preglednica 6 Sekvenciranje knjižnic RNK ali DNK

Vrsta knjižnice	Najmanj*	Največ*
Samo RNK	3	16
Samo DNK	3	8

* NTC ne prispevajo h kompleksnosti.

Preglednica 7 Sekvenciranje RNK in DNK knjižnic na isti pretočni celici

Vrsta knjižnice	Najmanj*	Največ*
RNK	3	8
DNK	3	8

* NTC ne prispevajo h kompleksnosti.

Za optimalno uporabo reagenta pri sekvenciranju knjižnic DNK in RNK z izdelkom TSO Comprehensive (EU) na Instrument NextSeq 550Dx, sekvencirajte 8 knjižnic RNK in 8 knjižnic DNK na pretočno celico.

Indeksni začetni oligonukleotidi enolično identificirajo vsak vzorec, tako da se lahko knjižnice združijo za sekvenciranje na eni pretočni celici. Združljive kombinacije indeksov se prikažejo na zaslonu Create Run (Ustvari izvedbo) med nastavitvijo izvedbe na Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo. Med pripravo knjižnice dodajte indeksni začetni oligonukleotid v vsako knjižnico vzorca. *Za vsako knjižnico vzorca uporabite drugo mešanico indeksnih začetnih oligonukleotidov.*

Prepričajte se, da se indeksni začetni oligonukleotidi, ki jih uporabljate z vzorci, ujemajo z indeksi, ki jih izberete za analizo s programsko opremo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo. *Neujemanja povzročijo nepravilno poročanje o rezultatih zaradi izgube pozitivne identifikacije vzorca.*

Obstajata dve vrsti indeksov v testu TSO Comprehensive (EU).

- **Indeksi UPxx** – Uporabite indekse UPxx za knjižnice, pridobljene iz vzorcev RNK ali DNK.
- **Indeksi CPxx** – Uporabite indekse CPxx za knjižnice, pridobljene iz vzorcev DNK. Indeksov CPxx ne uporabljajte za knjižnice, pridobljene iz RNK, ali če skupno sekvencirate samo tri knjižnice DNK.

Pri sekvenciranju samo treh knjižnic veljajo naslednje zahteve:

- Knjižnice morajo biti vse DNK ali vse RNK.
- Ne uporabljajte kompletov indeksov CPxx.
- Za zagotavljanje zadostne raznolikosti je potreben eden od naslednjih kompletov indeksov UPxx:
 - UP01, UP02 in UP03
 - UP04, UP05 in UP06
 - UP07, UP08 in UP09
 - UP10, UP11 in UP12

Prvi knjižnici je na primer dodeljen UP01, drugi knjižnici UP02 in tretji knjižnici UP03.

TruSight Oncology Kontrole

TSO Comprehensive (EU) zahteva kontrolo Kontrole TruSight Oncology, ki je sestavljena iz DNK-kontrole TruSight Oncology in RNK-kontrole TruSight Oncology kot pozitivnih kontrol. Vključite kontrolo DNK TruSight Oncology pri vsaki izvedbi sekvenciranja DNK in kontrolo RNK TruSight Oncology pri vsaki izvedbi sekvenciranja RNK znotraj zadevnega dogodka priprave knjižnice (vključite tudi kontrole za kombinirane DNK- in RNK-izvedbe). Za vsako načrtovano sekvenciranje se pripravi edinstvena pozitivna kontrola. Za več informacij glejte Navodila za uporabo kontrol TruSight Oncology (dokument št. 200009919).

Količina vnosa pozitivne kontrole je 40 ng za DNK in RNK.

Vključite ustrezno NTC pri vsakem dogodku priprave knjižnice RNK in DNK. NTC se večkrat sekvencira znotraj enega dogodka priprave knjižnice. Upoštevajte naslednje smernice za Kontrole TruSight Oncology:

- Knjižnice pripravite iz pozitivnih kontrol in kontrol brez predloge, identičnih vzorcem.
- Uporabite TEB za DNK NTC.
- Za RNK NTC uporabite vodo brez DNase/RNaze.
- Pozitivne kontrole so vključene v maksimalno zahtevo glede knjižnice.
- NTC niso vključeni v minimalno zahtevo glede knjižnice.
- Pri sekvenciranju samo 3 knjižnic uporabite indekse UP za NTC.
- Ker se NTC sekvencira večkratno, indeksov, izbranih za to kontrolo, ni mogoče ponovno uporabiti pri dogodku priprave knjižnice.

V spodnjih preglednicah so prikazani primeri postavitve plošče za pripravo knjižnice. Vsak oštevilčen stolpec predstavlja posamezno izvedbo sekvenciranja. Pri hkratnem sekvenciranju knjižnic DNK in RNK vsak ustrezajoč niz stolpcev predstavlja posamezno izvedbo sekvenciranja (na primer stolpec 1 in stolpec 7). NTC se sekvencira za vsak stolpec ali niz stolpcev.

Preglednica 8 Dogodek priprave knjižnice pri eni izvedbi, ki zajema šest bolnikovih vzorcev

	1	2	3	4	5	6	7
A	Poz. kontrola DNK	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	Poz. kontrola RNK
B	DNK 1	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 1
C	DNK 2	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 2
D	DNK 3	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 3
E	DNK 4	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 4
F	DNK 5	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 5
G	DNK 6	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 6
V	DNK NTC	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK NTC

Preglednica 9 Dogodek priprave knjižnice pri treh izvedbah, ki zajemajo 20 bolnikovih vzorcev

	1	2	3	4	5	6	7
A	Poz. kontrola DNK	Poz. kontrola DNK	Poz. kontrola DNK	prazno	Poz. kontrola RNK	Poz. kontrola RNK	Poz. kontrola RNK
B	DNK 1	DNK 7	DNK 14	prazno	RNK 1	RNK 7	RNK 14
C	DNK 2	DNK 8	DNK 15	prazno	RNK 2	RNK 8	RNK 15
D	DNK 3	DNK 9	DNK 16	prazno	RNK 3	RNK 9	RNK 16
E	DNK 4	DNK 10	DNK 17	prazno	RNK 4	RNK 10	RNK 17
F	DNK 5	DNK 11	DNK 18	prazno	RNK 5	RNK 11	RNK 18
G	DNK 6	DNK 12	DNK 19	prazno	RNK 6	RNK 12	RNK 19
V	DNK NTC	DNK 13	DNK 20	prazno	RNK NTC	RNK 13	RNK 20

Navodila za uporabo

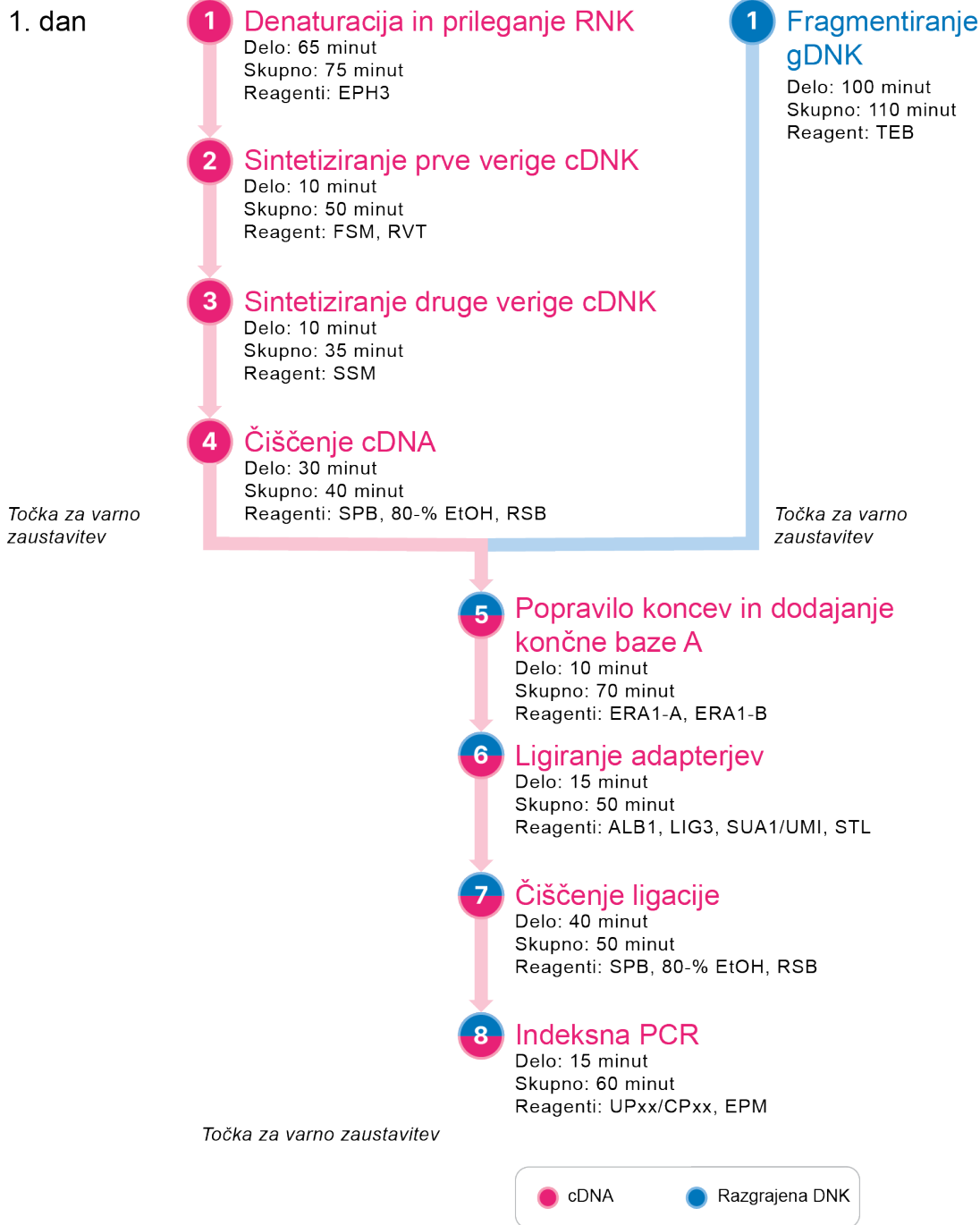
Pregled poteka dela TSO Comprehensive (EU) je prikazan na [Slika 1](#) in [Slika 2](#).

Potek dela za pripravo knjižnice

[Slika 1](#) prikazuje potek dela priprave knjižnice za TSO Comprehensive (EU). Knjižnice iz vzorcev RNK in DNK lahko sočasno pripravite v ločenih vdolbinicah. Pozitivne kontrole in kontrole brez predloge se obdelujejo enako kot vzorci. Med koraki so označene točke za varno zaustavitev.

Pred zagonom protokola vnesite podatke o izvedbi in vzorcu v Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo. Glejte *Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661)*.

Slika 1 TSO Comprehensive (EU) Potek dela (1. del)

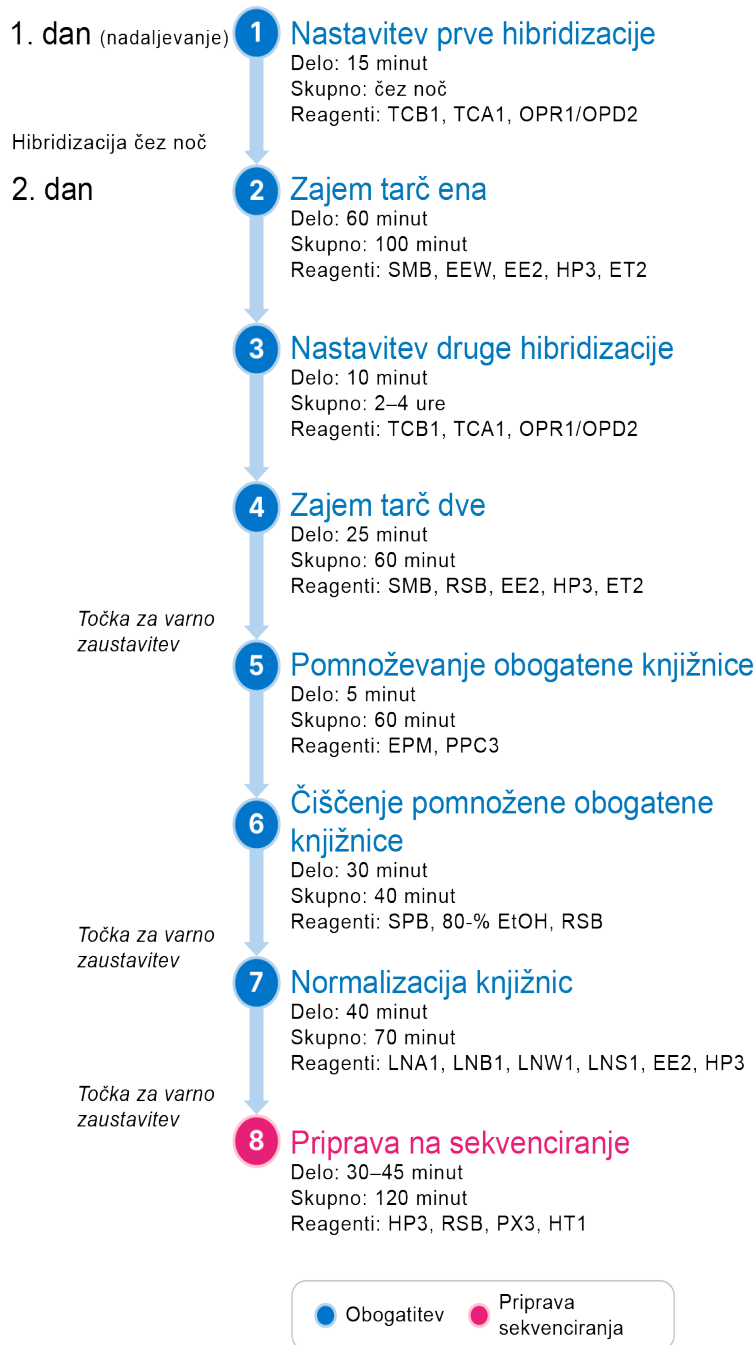


* Delo in skupni časi so približni.

Potek dela obogatitve

Slika 2 prikazuje potek dela obogatitve za TSO Comprehensive (EU). Med koraki so označene točke za varno zaustavitev.

Slika 2 TSO Comprehensive (EU) Potek dela (2. del)



Programiranje cikličnega termostata

Pred zagonom testa shranite naslednje programe na cikličnih termostatih pred in po pomnoževanju.

Preglednica 10 Programi termalnega cikla pred pomnoževanjem

Korak postopka	Ime programa	Temperatura pokrova	Reakcijski volumen	Parametri cikličnega termostata
Denaturacija in vezava RNK	LQ-RNK	100 °C	17 µl	• 5 minut pri 65 °C • 1 minuto pri 4 °C • Ohranite na temperaturi 4 °C
Sintetiziranje prve verige cDNK	1stSS	100 °C	25 µl	• 10 minut pri 25 °C • 15 minut pri 42 °C • 15 minut pri 70 °C • 1 minuto pri 4 °C • Ohranite na temperaturi 4 °C
Sintetiziranje druge verige cDNK	2ndSS	30 °C	50 µl	• 25 minut pri 16 °C • 1 minuto pri 4 °C • Ohranite na temperaturi 4 °C

OPOMBA Če temperature pokrova za 2ndSS ni mogoče nastaviti na 30 °C, izklopite možnost ogrevanja pokrova.

Preglednica 11 Programi termalnega cikla po pomnoževanju

Korak postopka	Ime programa	Temperatura pokrova	Reakcijski volumen	Parametri cikličnega termostata
Indeksna PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	• 30 sekund pri 98 °C • 15 ciklov: • 10 sekund pri 98 °C • 60 °C za 30 sekund • 30 sekund pri 72 °C • 5 minut pri 72 °C • Ohranite na temperaturi 10 °C.
Izvedite prvo hibridizacijo	HYB1	100 °C	50 µl	• 10 minut pri 95 °C • 2 minuti in 30 sekund pri 85 °C • 2 minuti in 30 sekund pri 75 °C • 2 minuti in 30 sekund pri 65 °C • Držite pri 57 °C 8 do 24 ur

Korak postopka	Ime programa	Temperatura pokrova	Reakcijski volumen	Parametri cikličnega termostata
Izvedite drugo hibridizacijo	HYB2	100 °C	50 µl	• 10 minut pri 95 °C • 2 minuti in 30 sekund pri 85 °C • 2 minuti in 30 sekund pri 75 °C • 2 minuti in 30 sekund pri 65 °C • Držite pri 57 °C 1,5 do 4 ure
Pomnoževanje obogatene knjižnice	EL-PCR	100 °C	50 µl	• 30 s pri 98 °C • 18 ciklov: • 10 s pri 98 °C • 30 s pri 60 °C • 30 s pri 72 °C • 5 minut pri 72 °C • Ohranite na temperaturi 10 °C.

Priprava na protokol

Ta priprava je potrebna za izvajanje korakov protokola, ki vodijo do naslednje točke za varno zaustavitev.



POZOR

Vsi postopki v poteku dela zahtevajo okolje brez RNaze/DNase.

1. Temeljito dekontaminirajte delovna območja s čistilom, ki zavira RNazo/DNazo.
2. Prepričajte se, da so programi cikličnega termostata pred pomnoževanjem nastavljeni. Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
3. Za nastavitev ultrazvočne naprave sledite navodilom proizvajalca ultrazvočne naprave.
4. Če obdelujete samo vzorce DNK, nadaljujte neposredno na [Fragmentiranje gDNK na strani 48](#).
5. Vzemite kontrole RNK iz shrambe.
6. Odstranite epruvete z reagentom iz škatle in upoštevajte navodila za odtajanje.

Preglednica 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (št. dela 20031127)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
EPH3	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Denaturacija in prileganje RNK
FSM	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Sintetiziranje prve verige cDNK
RVT	od -25 °C do -15 °C	Ohranjajte hladno.	Sintetiziranje prve verige cDNK
SSM	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Sintetiziranje druge verige cDNK

Preglednica 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (hlajen) (št. dela 20031119)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
SPB (svetlo zelena oznaka)	od 2 °C do 8 °C	30 minut pustite pri sobni temperaturi.	Čiščenje cDNK
RSB	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Čiščenje cDNK

Denaturacija in prileganje RNK

Ta proces denaturira prečiščeno RNK in na začetek doda naključne heksamere v pripravi na sintezo cDNK.

Priprava

- Pripravite naslednje reagente.
 - EPH3 – odstavite.
 - FSM – vibracijsko premešajte. Na kratko centrifugirajte in nato premešajte s pipetiranjem. Reagent lahko vsebuje bele delce, povezane z izdelkom. Nobeno dejanje uporabnika ni potrebno. Nima vpliva na učinkovitost izdelka.
 - RVT – na kratko centrifugirajte in nato premešajte s pipetiranjem. Ohranjajte hladno.

OPOMBA RVT je viskozna raztopina. Med pipetiranjem zmanjšajte nastajanje mehurčkov.

- V mikrocentrifugirki združite naslednje količine za pripravo osnovne mešanice FSM + RVT.

Preglednica 14 Osnovna mešanica FSM + RVT*

Komponenta osnovne mešanice	4 knjižnice (µl)	8 knjižnic (µl)	16 knjižnic (µl)	24 knjižnic (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Ta preglednica vključuje presežek količine. Za izračune glejte [Rokovanje z reagenti na strani 33](#).

- Pipetirajte 10-krat, da se premeša.
- Osnovno mešanico FSM + RVT shranjujte na hladnem, dokler ne [Sintetiziranje prve verige cDNK na strani 44](#).

Postopek

- Med odtajanjem hranite ekstrahirane vzorce RNK in kontrole RNK na hladnem. Kontrole RNK obdelajte kot vzorce za preostanek protokola.

2. Ko RNK ni v uporabi, naj bo na hladnem. Za količinsko opredelitev vzorcev glejte [Zahteve glede vzorca na strani 26](#).
3. Vsak vzorec RNK 10-krat pipetirajte, da se premeša.
4. Za pripravo 40 ng vsakega vzorca RNK v končni količini 8,5 µl (4,7 ng/µl) uporabite RNase/DNase-free water.
Za kontrole RNK uporabite koncentracijo, ki je navedena na oznaki epruvete.
5. Označite novo PCR ploščo s 96 vdolbinicami s CF (cDNK fragmenti).
6. Dodajte 8,5 µl vsakega vzorca RNK v edinstveno vdolbinico plošče CF PCR.
7. Med nastavitvijo izvedbe se prepričajte, da se postavitev plošče z vzorci in indeksi za vsak vzorec ujemajo z načrtovano izvedbo na Modul za analizo TSO Comprehensive (EU).
8. Vibracijsko premešajte EPH3, nato na kratko centrifugirajte.
9. V vsako vzorčno vdolbinico dobro dodajte 8,5 µl EPH3.
10. Na ploščo CF PCR nanesite samolepilno tesnilo.

**POZOR**

V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.

11. 1 minuto stresajte pri 1200 vrt./min.
12. Centrifugirajte pri 280 × g 1 minuto.
13. Postavite jo na ciklični termostat in zaženite program LQ-RNA.
Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
14. Ko vzorci dosežejo 4 °C, počakajte 1 minuto. Takoj nadaljujte z naslednjim korakom.

Sintetiziranje prve verige cDNK

Ta proces obratno prepisuje fragmente RNK, ki so bili pripravljeni z naključnim heksameri v prvo verigo cDNK z uporabo reverzne transkriptaze (reverse transcriptase).

Postopek

1. Odstranite ploščo CF PCR iz cikličnega termostata.
2. Pipetirajte 10-krat, da se osnovna mešanica FSM + RVT premeša. Prepričajte se, da je mešanica FSM + RVT popolnoma homogena.
3. V vsako vdolbinico z vzorcem dodajte 8 µl osnovne mešanice FSM + RVT.
4. Pipetirajte 10-krat, da se premeša.
5. Zavrzite preostalo osnovno mešanico FSM + RVT.
6. Na ploščo CF PCR nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
7. 1 minuto stresajte pri 1200 vrt./min.

8. Centrifugirajte pri $280 \times g$ 1 minuto.
9. Postavite na ciklični termostat in zaženite program 1stSS.
Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
10. Ko vzorci dosežejo 4°C , takoj nadaljujte z naslednjim korakom.
Prve vzorce verige lahko hranite pri 4°C do največ 5 minut.

Sintetiziranje druge verige cDNK

Ta postopek odstrani predlogo RNK in sintetizira dvoverižno cDNK.

Priprava

1. Priprava SSM:
 - a. Obrnite 10-krat, da premešate.
 - b. Na kratko centrifugirajte. Reagent lahko vsebuje bele delce, povezane z izdelkom. Potreben ni noben ukrep. Nima vpliva na učinkovitost izdelka.

Postopek

1. Odstranite ploščo CF PCR iz cikličnega termostata.
2. V vsako vzorčno vdolbinico dobro dodajte 25 μl SSM.
3. Na ploščo CF PCR nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
4. 1 minuto stresajte pri 1200 vrt./min.
5. Centrifugirajte pri $280 \times g$ 1 minuto.
6. Postavite na ciklični termostat in zaženite program 2ndSS.
Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
7. Ko vzorci dosežejo 4°C , počakajte 1 minuto in takoj nadaljujte z naslednjim korakom.

Čiščenje cDNK

Ta postopek uporablja SPB za čiščenje cDNK neželenih reakcijskih komponent. Kroglice se dvakrat sperejo s svežim 80-odstotnim etanolom. cDNK se eluira z RSB.

Priprava

1. Pripravite naslednje reagente.
 - SPB – poskrbite, da bodo kroglice pri sobni temperaturi 30 minut.
 - RSB – za uporabo v postopku ga dajte na stran.
2. Pripravite svež 80-odstotni etanol v konični epruveti z volumnom 15 ml ali 50 ml, kot sledi.

Preglednica 15 Pripravite svež 80-odstotni EtOH.

Reagent	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic
100 % EtOH, čist	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Vrtinčite sveži 80 % EtOH, da premešate.
4. Označite novo 96-well MIDI ploščo z BIND1 (vezava cDNA).
5. Pokrijte in odložite.
6. Pripravite magnet.

Postopek

Vezava

1. Odstranite ploščo CF PCR iz cikličnega termostata.
2. Vibracijsko mešajte SPB 1 minuto, da se kroglice ponovno suspendirajo.
3. Takoj dodajte 90 µl SPB v vsako vdolbinico z vzorcem na plošči BIND1 MIDI.
Če se za razdeljevanje SPB uporablja korito, je treba pri alikvotiranju upoštevati faktor presežka 1,15, da se zagotovi zadostna količina materiala za vsak vzorec. Po dodajanju SPB v vsako vdolbinico z vzorcem zavržite preostali material.
4. Prenesite vso količino (50 µl) vsakega vzorca iz plošče CF PCR v ustrezno vdolbinico na plošči BIND1 MIDI.
5. Zavržite prazno ploščo CF PCR.
6. Na ploščo BIND1 MIDI nanosite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
7. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
8. Pri sobni temperaturi inkubirajte 5 minut.
9. Ploščo BIND1 MIDI postavite na magnetno stojalo za 5 minut.
10. Ploščo ohranite na magnetnem stojalu. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice z vzorcem odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.

Pranje

1. Kroglice operite na naslednji način.
 - a. Ploščo BIND1 MIDI imejte na magnetnem stojalu in v vsako vdolbinico dodajte 200 µl svežega 80-odstotnega EtOH.
 - b. Počakajte 30 sekund.
 - c. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice z vzorcem odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.
2. Kroglice **drugič** operite.

3. Uporabite pipeto s finimi konicami, da iz vsake vdolbinice odstranite preostali EtOH.
4. Zavržite neuporabljen 80-odstotni EtOH.

Elucija

1. Ploščo BIND1 MIDI odstranite z magnetnega stojala.
2. Obračajte ali vrtinčite RSB, da premešate.
3. V vsako vzorčno vdolbinico dobro dodajte 22 µl RSB.
4. Na ploščo BIND1 MIDI nanosite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
5. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
6. Pri sobni temperaturi inkubirajte 2 minuti.
7. Postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
8. Označite novo ploščo MIDI s 96 vdolbinicami s PCF (prečiščeni fragmenti cDNK).
Če ustavite delo na [TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV na strani 47](#), uporabite ploščo PCR.
9. Prenesite 20 µl eluata iz vsake vdolbinice z vzorcem s plošče BIND1 MIDI v ustrezno vdolbinico na plošči PCF.
10. Zavržite prazno ploščo BIND1 MIDI.
11. Dodajte 30 µl RSB v vsako vdolbinico z vzorcem na plošči PCF.
12. Pipetirajte 10-krat, da se premeša.
13. Na ploščo PCF nanosite samolepilno folijo in shranite na hladnem.
14. Vrnite EPH3, FSM, RVT in SSM v shrambo.
15. Če obdelujete samo vzorce, pridobljene iz RNK (cDNK), in se ne ustavljate na mestu za varno zaustavitev, nadaljujte s [Popravilo koncev in dodajanje končne baze A na strani 51](#).

TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če boste postopek prekinili, centrifugirajte ploščo PCF PCR 1 minuto pri 280 × g in jo shranite pri temperaturi od -25 °C do -15 °C za največ 7 dni.

Priprava na protokol

Ta priprava je potreba za izvajanje korakov protokola, ki vodijo do naslednje točke za varno zaustavitev.

1. Vzemite kontrole DNK iz shrambe.
2. Odstranite epruveto z reagentom iz škatle in upoštevajte navodila za odtajanje.

Preglednica 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (hlajen) (št. dela 20031119)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
TEB	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Fragmentiranje gDNK

Fragmentiranje gDNK

Ta postopek fragmentira gDNK in ustvari dvoverižne fragmente DNK (dsDNK) s 3' ali 5' previsi.

Priprava

1. Za kvantifikacijo vzorcev upoštevajte priporočila v razdelku [Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27](#).
2. Pripravite TEB – obračajte ali vrtinčite, da premešate.

Postopek

Priprava plošče

Izberite eno od naslednjih možnosti za pripravo plošče:

- Obdelajte vzorce gDNK hkrati z vzorci cDNK na plošči PCF MIDI.
 - a. Označite ploščo PCF MIDI z LP (Library Preparation – priprava knjižnice).
 - b. Hranite na hladnem in shranite za uporabo v [Prenos fragmentirane DNK na strani 49](#).
- Obdelajte vzorce gDNK hkrati z vzorci cDNK, plošča PCF PCR je zmrznjena.
 - a. Ploščo PCF PCR odmrznite na sobno temperaturo.
 - b. Centrifugirajte pri 280 × g 1 minuto.
 - c. Pipetirajte 10-krat, da se premeša.
 - d. Označite novo MIDI ploščo s 96 vdolbinicami z LP (priprava knjižnice).
 - e. Prenesite vseh 50 µl vsakega vzorca iz plošče PCF PCR v ustrezno vdolbinico na plošči LP MIDI.
 - f. Zavrzite ploščo PCF PCR.
 - g. Nanesite samolepilno folijo in hranite na hladnem do [Prenos fragmentirane DNK na strani 49](#).
- Obdelajte samo vzorce gDNK.
 - a. Označite novo MIDI ploščo s 96 vdolbinicami z LP (priprava knjižnice).
Če ustavite delo na [TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV na strani 49](#), uporabite ploščo PCR.
 - b. Pokrijte in shranite za uporabo v [Prenos fragmentirane DNK na strani 49](#).

Razredčite gDNK

1. Odtajajte vzorce gDNK in kontrole DNK pri sobni temperaturi.
2. Vsak vzorec gDNK 10-krat pipetirajte, da se premeša.
3. Na kratko centrifugirajte epruveto, da se kapljice zberejo.
4. Obračajte ali vibracijsko premešajte TEB.
5. Uporabite TEB za pripravo vsakega vzorca gDNK v končni količini 52 µl. Za vhodne količine in najmanjše koncentracije glede na vrsto vzorca glejte naslednjo preglednico.

- Test zahteva minimalno koncentracijo ekstrakcije, da se omogoči vsaj 40 µl TEB količine 52 µl.
- Za kontrole DNK uporabite koncentracijo, ki je navedena na oznaki epruvete.
- Da preprečite izgubo vzorca, v to razredčitev ne pipetirajte manj kot 2 µl vzorca.

Vrsta vzorca	Vhodna količina (ng)	Najmanjša koncentracija (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrola	40	Glejte nalepko na epruveti

Fragment

1. Dodajte 52 µl vsakega vzorca gDNK v ločeno vdolbinico epruvete ultrazvočne naprave.



POZOR

gDNK počasi napolnite v epruveto in se prepričajte, da na dnu epruvete ni zračnih vrzeli. Za več informacij glejte [Test na strani 29](#) in navodila proizvajalca.

2. Zabeležite usmerjenost traku.
3. Fragmentirajte gDNK v fragmente z ultrazvočno napravo.

Prenos fragmentirane DNK

1. Poskrbite, da se postavitev plošče z vzorci in indeksi za vsak vzorec ujemajo z izvedbo, ki ste jo izbrali za analizo z Modul za analizo TSO Comprehensive (EU)
2. Za pridobivanje vzorca sledite navodilom proizvajalca ultrazvočne naprave.
Za nekatere vrste ultrazvočnih epruvet je potrebna centrifugacija, da se konsolidira vzorec v epruveti.
3. Za vsak vzorec fragmentirane gDNK uporabite pipeto s finimi konicami, da izvedete tri prenose količine 16,7 µl v prazno vdolbinico plošče LP MIDI.
4. Na ploščo LP MIDI nanesite samolepilno folijo.

TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če ustavite potek dela, na ploščo LP PCR nanesite samolepilno folijo in centrifugirajte 1 minuto pri 280 × g. Shranjujte pri temperaturi od -25 °C do -15 °C do največ 7 dni.

Priprava na protokol

Ta priprava je potrebna za izvajanje korakov protokola, ki vodijo do naslednje točke za varno zaustavitev. Prepričajte se, da so nastavljeni programi cikličnega termostata po pomnoževanju. Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).

1. Pripravite vedro z ledom ali podobno.
2. Odstranite epruvete z reagentom iz škatle in upoštevajte navodila za odtajanje.

Preglednica 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznite) (kat. št. 20031118)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
ERA1-A	od -25 °C do -15 °C	Ohranjajte hladno.	Popravilo koncev in dodajanje končne baze A
ERA1-B	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Popravilo koncev in dodajanje končne baze A
ALB1	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Ligiranje adapterjev
LIG3	od -25 °C do -15 °C	Ohranjajte hladno.	Ligiranje adapterjev
SUA1 (modri pokrovček)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Ligiranje adapterjev
UMI (beli pokrovček)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Ligiranje adapterjev
STL	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Ligiranje adapterjev
EPM	od -25 °C do -15 °C	Ohranjajte hladno.	Indeksna PCR

Preglednica 18 Škatla TruSight Oncology Comp Library Prep (shranjujte v hladilniku) (št. dela 20031119)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
SPB (svetlo zelena oznaka)	od 2 °C do 8 °C	30 minut pustite pri sobni temperaturi.	Čiščenje ligacije
RSB	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Čiščenje ligacije

Preglednica 19 Škatla TruSight Oncology Comp UP Index Primers, št. dela 20031120

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
UPxx	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite ustrezne epruvete z indeksnimi začetnimi oligonukleotidi do sobne temperature.	Indeksna PCR

Preglednica 20 Škatla TruSight Oncology Comp CP Index Primers (št. dela 20031126)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
CPxx	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite ustrezne epruvete z indeksnimi začetnimi oligonukleotidi do sobne temperature.	Indeksna PCR

Popravilo koncev in dodajanje končne baze A

Ta postopek popravi previse, nastale pri fragmentaciji, v konce z A-previsi z uporabo osnovne mešanice End Repair A-Tailing (ERA1).

Aktivnost eksonukleaze 3' do 5' v tej mešanici odstrani 3' previse, aktivnost polimeraze 5' do 3' pa zapolni 5' previse. Med to reakcijo se koncem 3' dodajo A-nukleotidi, da se prepreči njihovo medsebojno ligiranje med reakcijo ligacije adapterjev.

Priprava

- Dva inkubatorja za mikrovzorke predhodno segrevajte z vložki grelnega bloka MIDI, kot sledi.
 - Inkubator mikrovzorcev predhodno segrejte na 30 °C.
 - Inkubator mikrovzorcev predhodno segrejte na 72 °C.
- Pripravite naslednje reagente.
 - ERA1 – na kratko centrifugirajte in nato premešajte s pipetiranjem. Ohranjajte hladno.
 - ERA1 – premešajte z vrtinčenjem, nato pa na kratko centrifugirajte.
Preglejte glede oborine. Če je prisotna, segrejte epruveto na 37 °C in jo nato mešajte s pipetiranjem, dokler se oborine ne raztopijo.
- Pripravite osnovno mešanico ERA1 v mikrocentrifugirki.

Preglednica 21 Osnovna mešanica ERA1*

Komponenta osnovne mešanice	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic	48 knjižnic
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

* Ta preglednica vključuje presežek količine. Za izračune glejte [Rokovanje z reagenti na strani 33](#).

- Počasi 10-krat pipetirajte, da zagotovite homogenost, nato pa na kratko centrifugirajte. Osnovno mešanico ERA1 shranjujte na hladnem.
- Izberite eno od naslednjih možnosti za pripravo plošče:
 - Če so vzorci na plošči MIDI, pripravite naslednje.
 - Ponovno označite ploščo MIDI LP2 (priprava knjižnice 2).

- b. Če so nekateri vzorci v ločenih ploščah MIDI, premaknite vse vzorce, da ločite vdolbinice iste plošče MIDI glede na postavitev plošče.
- Če je plošča zamrznjena, jo pripravite na naslednji način.
 - a. Ploščo PCF PCR ali ploščo LP PCR odmrznite na sobno temperaturo.
 - b. Ploščo centrifugirajte 1 minuto pri $280 \times g$.
 - c. Pipetirajte 10-krat, da se premeša.
 - d. Označite novo ploščo MIDI LP2 s 96 vdolbinicami (priprava knjižnice 2).
 - e. Prenesite vseh 50 μ l posameznega vzorca iz plošče PCF PCR ali plošče LP PCR v ustrezno vdolbinico na plošči LP2 MIDI.
 - f. Zavrzite ploščo PCF PCR ali LP PCR.

Postopek

1. V vsako vdolbinico z vzorcem na plošči LP2 MIDI dodajte 10 μ l osnovne mešanice osnovne mešanice ERA1.
2. Zavrzite preostalo osnovno mešanico ERA1.
3. Na ploščo LP2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
4. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
5. Inkubirajte 30 minut v ogretem inkubatorju mikrovzorcev pri 30 °C.
6. Takoj prenesite v drugi predhodno ogreti inkubator mikrovzorcev.
7. Inkubirajte 20 minut pri 72 °C.
8. Plošča LP2 MIDI naj bo 5 minut na hladnem.

Ligiranje adapterjev

Ta postopek veže adapterje na konce fragmentov cDNK in/ali gDNK.

Test TSO Comprehensive (EU) vključuje adapterje SUA1 in UMI.

- Uporabite adapterje SUA1 z vzorci RNK.
- Adapterje UMI uporabite z vzorci DNK.

Priprava

1. Pripravite naslednje reagente.
 - ALB1 – vrtinčite najmanj 10 sekund, da premešate, nato pa na kratko centrifugirajte.
 - LIG3 – na kratko centrifugirajte in nato premešajte s pipetiranjem. Ohranjajte hladno.
 - SUA1 – vrtinčite najmanj 10 sekund, da premešate, nato pa na kratko centrifugirajte.
 - UMI – vrtinčite najmanj 10 sekund, da premešate, nato pa na kratko centrifugirajte.
 - STL – za uporabo v postopku ga dajte na stran.

Postopek

1. Odstranite ploščo LP2 MIDI z ledu ali enakovrednega.
2. Dodajte 60 µl ALB1 v vsako vdolbinico z vzorcem na plošči LP2 MIDI. ALB1 je viskozna raztopina. Pipetirajte počasi, da zmanjšate nastajanje mehurčkov.
3. V vsako vzorčno vdolbinico dobro dodajte 5 µl LIG3.
4. Adapterje dodajte na naslednji način.
Ne kombinirajte različnih tipov adapterjev skupaj.
 - **[Vdolbinice z vzorcem RNK]** – dodajte 10 µl SUA1 (modri pokrovček) vsakemu vzorcu, pridobljenemu iz RNK.
 - **[Vdolbinice z vzorcem DNK]** – dodajte 10 µl UMI (beli pokrovček) vsakemu vzorcu, pridobljenemu iz DNK.
5. Na ploščo LP2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
6. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
7. Pri sobni temperaturi inkubirajte 30 minut.
8. Vibracijsko premešajte STL, nato na kratko centrifugirajte.
9. Dodajte 5 µl STL v vsako vdolbinico z vzorcem na plošči LP2 MIDI.
10. Na ploščo LP2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
11. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.

Čiščenje ligacije

Ta postopek uporablja SPB za čiščenje fragmentov cDNK ali gDNK, ki so ligirani z adapterjem, in odstranjevanje neželenih produktov. Kroglice se dvakrat sperejo s svežim 80-odstotnim etanolom. Vzorci, ligirani z adapterjem, se eluirajo z RSB.

Priprava

1. Pripravite naslednje reagente.
 - SPB – poskrbite, da bodo kroglice pri sobni temperaturi 30 minut.
 - RSB – za uporabo v postopku ga dajte na stran.
2. Pripravite svež 80-odstotni EtOH v konični epruveti z volumnom 15 ml ali 50 ml.

Preglednica 22 Pripravite svež 80-odstotni etanol.

Reagent	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic	48 knjižnic
100 % EtOH, čist	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml

Reagent	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic	48 knjižnic
RNase/DNase-free water (voda brez RNase/DNase)	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Vrtinčite sveži 80 % EtOH, da premešate.
4. Pripravite magnet.

Postopek

Vezava

1. Vibracijsko mešajte SPB 1 minuto, da se kroglice ponovno suspendirajo.
2. Takoj dodajte 112 µl SPB v vsako vdolbinico z vzorcem na plošči LP2 MIDI.
Če se za razdeljevanje SPB uporablja korito, je treba pri alikvotiranju upoštevati faktor presežka 1,15, da se zagotovi zadostna količina materiala za vsak vzorec. Po dodajanju SPB v vsako vdolbinico z vzorcem zavržite preostali material.
3. Na ploščo LP2 MIDI nanosite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
4. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
5. Pri sobni temperaturi inkubirajte 5 minut.
6. Ploščo LP2 MIDI postavite na magnetno stojalo za 10 minut.
7. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice z vzorcem odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.

Pranje

1. Kroglice operite na naslednji način.
 - a. Ploščo LP2 MIDI imejte na magnetnem stojalu in v vsako vdolbinico z vzorcem dodajte 200 µl svežega 80-odstotnega EtOH.
 - b. Počakajte 30 sekund.
 - c. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice z vzorcem odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.
2. **Ponovno** operite kroglice (drugič).
3. Uporabite pipeto s finimi konicami, da iz vsake vdolbinice odstranite preostali EtOH.
4. Zavržite neuporabljen 80-odstotni EtOH.

Elucija

1. Ploščo LP2 MIDI odstranite z magnetnega stojala.
2. Obračajte ali vrtinčite RSB, da premešate.

3. V vsako vzorčno vdolbinico dobro dodajte 27,5 µl RSB.
4. Na ploščo LP2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
5. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
6. Pri sobni temperaturi inkubirajte 2 minuti.
7. Ploščo LP2 MIDI postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
8. Označite novo ploščo PCR s 96 vdolbinicami z LS (Library Samples – vzorci knjižnice).
9. Prenesite 25 µl eluata iz plošče LP2 MIDI v ustrezno vdolbinico na plošči LS PCR.
10. Zavržite prazno ploščo LP2 MIDI.

Indeksna PCR

V tem koraku se fragmenti knjižnice pomnožijo z uporabo začetnih oligonukleotidov, ki dodajajo zaporedja indeksov za multipleksiranje vzorcev. Produkt tega vsebuje celotno knjižnico fragmentov cDNK in/ali DNK, obdanih z adapterji, potrebnimi za ustvarjanje gruč.

Priprava

1. Pripravite naslednje reagente.
 - EPM – shranjujte na hladnem.
 - UPxx – vrtničite, da premešate, nato na kratko centrifugirajte. UPxx je indeksni začetni oligonukleotid, izbran na zaslonu Create Run (Ustvari izvedbo) v programski opremi Local Run Manager med nastavitvijo izvedbe.
 - CPxx – vrtničite, da premešate, nato na kratko centrifugirajte. CPxx je indeksni začetni oligonukleotid, izbran na zaslonu Create Run (Ustvari izvedbo) v programski opremi Local Run Manager med nastavitvijo izvedbe.
2. Med nastavitvijo izvedbe se prepričajte, da se indeksi za vsak vzorec ujemajo z načrtovano izvedbo na Modul za analizo TSO Comprehensive (EU). Upoštevajte navodila glede izbire indeksa v razdelku [Število knjižnic in izbor indeksov na strani 35](#).



POZOR

Neujemanja med vzorci in indeksnimi začetnimi oligonukleotidi povzročijo nepravilno poročanje o rezultatih zaradi izgube pozitivne identifikacije vzorca.

Postopek

1. Dodajte 5 µl ustreznega indeksnega začetnega oligonukleotida (UPxx ali CPxx) v ustrezno vdolbinico za vzorec na plošči LS PCR glede na izbrane indekse.

**POZOR**

Sočasno uporabljajte in odprite samo eno epruveto indeksnega začetnega oligonukleotida. Vsako epruveto z indeksom ponovno zaprite z novim pokrovčkom takoj po uporabi. Ne kombinirajte indeksnih začetnih oligonukleotidov.

2. Vrtinčite EPM 5 sekund, da premešate, nato pa na kratko centrifugirajte.
3. V vsako vzorčno vdolbinico dodajte 20 µl EPM.
4. Na ploščo LS PCR nanosite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
5. 1 minuto stresajte pri 1200 vrt./min.
6. Reagente za korake pred pomnoževanjem vrnite v shrambo.

**POZOR**

Izvedite vse nadaljnje korake na območju po pomnoževanju, da preprečite prenos produktov pomnoževanja.

7. Ploščo LS PCR centrifugirajte 1 minuto pri 280 × g.
8. Postavite jo na predhodno programirani ciklični termostat po pomnoževanju in zaženite program I-PCR.
Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
Če nadaljujete z [Nastavitvijo prve hibridizacije na strani 57](#), upoštevajte navodila za odtajanje reagentov pri korakih protokola priprave.
9. Po zaključku programa I-PCR ploščo LS PCR 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g.
10. Ponovno označite ploščo ALS (Amplified Library Samples – pomnoženi vzorci knjižnice).

TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če ustavite potek dela, ploščo ALS PCR shranjujte do 30 dni pri temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Priprava na protokol

Ta priprava je potrebna za izvajanje korakov protokola, ki vodijo do hibridizacije čez noč.

1. Prepričajte se, da so nastavljeni programi cikličnega termostata po pomnoževanju. Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
2. Odstranite epruvete z reagentom iz škatle in upoštevajte navodila za odtajanje.

Preglednica 23 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (shranjujte v hladilniku) (št. dela 20031123)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
TCB1	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Nastavitev prve hibridizacije

Preglednica 24 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznjen) (št. dela 20031121)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
TCA1	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Nastavitev prve hibridizacije

Preglednica 25 Škatla TruSight Oncology Comp Content Set (št. dela 20031122)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
OPR1 (rdeči pokrovček)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Nastavitev prve hibridizacije
OPD2 (beli pokrovček)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Nastavitev prve hibridizacije

Nastavitev prve hibridizacije

Med tem postopkom zbirke oligonukleotidov hibridizira s knjižnicami cDNK, in zbirke oligonukleotidov hibridizira s knjižnicami gDNK, pripravljenimi v postopku [Indeksna PCR na strani 55](#). Obogatitev tarčnih regij zahteva dva koraka hibridizacije. Pri prvi hibridizaciji oligonukleotidi čez noč hibridizirajo s knjižnicami cDNK in/ali gDNA (8 do 24 ur).

Priprava

1. Pripravite naslednje reagente.
 - TCB1 – epruveto 5 minut segrevajte pri 37 °C. Vibracijsko mešajte 10 sekund, nato pa na kratko centrifugirajte.
 - TCA1 – vibracijsko premešajte, nato na kratko centrifugirajte.
 - OPR1 – vibracijsko premešajte, nato na kratko centrifugirajte.
 - OPD2 – vibracijsko premešajte, nato na kratko centrifugirajte.

- Če je bila plošča ALS PCR shranjena, jo odtajajte na sobno temperaturo in nato 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g. Pipetirajte, da se premeša.
- Označite novo ploščo PCR s 96 vdolbinicami s HYB1 (hibridizacija 1).

Postopek

- Prenesite 20 µl vsake knjižnice cDNK in/ali gDNK iz plošče ALS PCR v ustrezno vdolbinico na plošči HYB1 PCR.
- Na ploščo ALS PCR nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
- Preglejte TCB1 glede oborine. Če je prisotna, ponovno segrejte epruveto in jo vibracijsko premešajte, dokler se kristali ne raztopijo.
- V vsako vdolbinico s knjižnico na plošči HYB1 PCR dodajte 15 µl TCB1.
- V vsako vdolbinico s knjižnico na plošči HYB1 PCR dodajte 10 µl TCA1.
- Dodajte sonde.
Ne kombinirajte različnih tipov sond skupaj. Dodajte samo en nabor sond na vdolbinico.
 - [vdolbinice s knjižnico RNK]** – Dodajte 5 µl OPR1 (rdeči pokrovček) v vsako knjižnico, pridobljeno iz RNK.
 - [Vdolbinice knjižnice DNK]** – Dodajte 5 µl OPD2 (beli pokrovček) v vsako knjižnico, pridobljeno iz DNK.
- Na ploščo HYB1 PCR nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
- 2 minuti stresajte pri 1200 vrt./min.
- Postavite jo na ciklični termostat in zaženite program HYB1.
Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
- Hibridizirajte pri 57 °C najmanj 8 ur do največ 24 ur.
- Reagente za hibridizacijo vrnite v shrambo.
- Ploščico ALS PCR hranite pri –25 °C do –15 °C do 30 dni.

Priprava na protokol

Ta priprava je potrebna za izvajanje korakov protokola, ki vodijo do naslednje točke za varno zaustavitev.

Na začetku 2. dne odstranite epruvete z reagentom iz škatle in upoštevajte navodila za odtajanje.

Preglednica 26 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (shranjujte v hladilniku) (št. dela 20031123)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
SMB (temno modra oznaka)	od 2 °C do 8 °C	30 minut pustite pri sobni temperaturi.	Zajem tarč ena Zajem tarč dve

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
ET2	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Zajem tarč ena Zajem tarč dve
HP3	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Zajem tarč ena Zajem tarč dve Normalizacija knjižnic
TCB1	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Nastavitev druge hibridizacije
RSB	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Zajem tarč dve Čiščenje ojačane in obogatene knjižnice

Preglednica 27 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznjen) (št. dela 20031121)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
EE2	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Zajem tarč ena Zajem tarč dve Normalizacija knjižnic
EEW	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Zajem tarč ena
TCA1	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Nastavitev druge hibridizacije

Preglednica 28 Škatla TruSight Oncology Comp Content Set (št. dela 20031122)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
OPR1 (rdeči pokrovček)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Nastavitev druge hibridizacije
OPD2 (beli pokrovček)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Nastavitev druge hibridizacije

Zajem tarč ena

Ta korak uporablja SMB za zajem sond, hibridiziranih v tarčne regije zanimanja. Kroglice se trikrat sperejo z EEW. Obogatene knjižnice se eluirajo s svežo elucijsko mešanico EE2 + HP3 in nevtralizirajo z ET2.

Priprava

1. Inkubator za mikrovzorke z vložkom grelnega bloka MIDI segrejte na 57 °C.
2. Pripravite naslednje reagente.

- EEW – vrtinčite 1 minuto, da premešate.
- EE2 – vrtinčite, da premešate, nato na kratko centrifugirajte.
- HP3 – vrtinčite, da premešate, nato na kratko centrifugirajte.
- SMB – zagotovite, da bodo kroglice na sobni temperaturi 30 minut.
Za ta postopek uporabite **SMB** in ne SPB.
- ET2 – za uporabo v postopku ga dajte na stran.

3. Pripravite svežo elucijsko mešanico EE2 + HP3 v mikrocentrifugirki.

Preglednica 29 Elucijska mešanica EE2 + HP3 za zajem tarč ena*

Komponenta elucijske mešanice	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic	48 knjižnic
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Ta preglednica vključuje presežek količine. Za izračune glejte [Rokovanje z reagenti na strani 33](#).

4. Elucijsko mešanico EE2 + HP3 vrtinčite in na kratko centrifugirajte. Postavite na stran za korak [Elucija na strani 61](#).
5. Označite novo MIDI ploščo s 96 vdolbinicami CAP1 (zajem 1).
6. Pripravite magnet.

Postopek

Vezava

1. Odstranite ploščo HXB1 PCR iz cikličnega termostata.
2. Ploščo HYB1 PCR centrifugirajte 1 minuto pri 280 × g.
3. Vibracijsko mešajte SMB 1 minuto, da se kroglice ponovno suspendirajo.
Če je prisotna oborina ali pelet kroglice, poskrbite, da bo dosežena sobna temperatura, pipetirajte, da se sprosti pelet, nato pa vibracijsko premešajte, da se ponovno suspendira.
4. Takoj dodajte 150 µl SMB v vsako vdolbinico s knjižnico na plošči CAP1 MIDI.
Če se za razdeljevanje SMB uporablja korito, je treba pri alikvotiranju upoštevati faktor presežka 1,15, da se zagotovi zadostna količina materiala za vsak vzorec.
5. Po dodajanju SMB v vsako vdolbinico z vzorcem zavržite preostali material.
6. Nastavite pipeto na 50 µl in prenesite vso količino vsake knjižnice s plošče HYB1 PCR v ustrezno vdolbinico na plošči CAP1 MIDI.
7. Zavržite prazno ploščo HYB1 PCR.
8. Na ploščo CAP1 MIDI nanosite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
9. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.

10. Inkubirajte 25 minut v ogretem inkubatorju mikrovzorcev pri 57 °C.
11. Ploščo CAP1 MIDI postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
12. Ploščo ohranite na magnetnem stojalu. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.

**POZOR**

Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ([Pranje na strani 61](#)). Ne dovolite, da bi bila kroglica dlje časa brez prisotnosti tekočine.

Pranje

1. Kroglice operite na naslednji način.
 - a. Ploščo CAP1 MIDI odstranite z magnetnega stojala.
 - b. V vsako vdolbinico dodajte 200 µl EEW.
 - c. Uporabite pipeto, nastavljeno na 150 µl, in pipetirajte vsaj 10-krat, da se premeša. Prepričajte se, da so vse kroglice ponovno suspendirane.

Zagotovite, da v konici ni pelet kroglic, tako da pazljivo aspirirate vso raztopino kroglic iz vdolbinice. Vizualno preglejte dno vsake vdolbinice. Če je prisotna kroglica, med pranjem nagnite konico pipete proti peletu, da ga odstranite. Prepričajte se, da je kroglica v celoti potopljena v raztopino. Raztopina mora izgledati temno rjavo in imeti homogeno konsistenco.
 - d. Na ploščo CAP1 MIDI nanesite samolepilno folijo.
 - e. V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
 - f. 4 minute stresajte pri 1800 vrt./min.
 - g. Inkubirajte 5 minut v inkubatorju mikrovzorcev pri 57 °C.
 - h. Ploščo CAP1 MIDI postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
 - i. Ploščo ohranite na magnetnem stojalu. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.
2. **Ponovno** operite kroglice (drugič).
3. Operite kroglice **tretjič**.
4. Uporabite pipeto s finimi konicami, da iz vsake vdolbinice odstranite preostali EEW.

Elucija

1. Ploščo CAP1 MIDI odstranite z magnetnega stojala.
2. Vibracijsko premešajte svežo mešanico za elucijo EE2 + HP3, nato na kratko centrifugirajte.
3. Pazljivo dodajte 17 µl mešanice za elucijo EE2 + HP3 v vsako vdolbinico s knjižnico na plošči CAP1 MIDI.
4. Zavržite preostalo mešanico za elucijo EE2 + HP3.
5. Na ploščo CAP1 MIDI nanesite samolepilno folijo.

V celoti zatesnite robove in vdolbinice.

6. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
7. Postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
8. Označite novo PCR ploščo s 96 vdolbinicami z ELU1 (elucija 1).
9. Vibracijsko premešajte ET2, nato na kratko centrifugirajte.
10. V vsako ustrezno vdolbinico s knjižnico na novi plošči ELU1 PCR dodajte 5 µl ET2.
11. Pazljivo prenesite 15 µl eluata iz vsake vdolbinice s knjižnico na plošči CAP1 MIDI v ustrezno vdolbinico na plošči ELU1 PCR.
12. Zavržite prazno ploščo CAP1 MIDI.
13. Na ploščo ELU1 PCR nanosite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
14. 2 minuti stresajte pri 1200 vrt./min.
15. Vrnite EEW v shrambo.

Nastavitev druge hibridizacije

Ta korak drugič veže tarčne regije obogatenih knjižnic cDNK in/ali gDNK s sondami za zajem. Druga hibridizacija zagotavlja visoko specifičnost zajetih regij. Da bi zagotovili optimalno obogatitev knjižnic, izvajajte drugi korak hibridizacije pri 57 °C najmanj 1,5 ure do največ 4 ure.

Priprava

1. Pripravite naslednje reagente.
 - TCB1 – epruveto 5 minut segrevajte pri 37 °C. Vibracijsko mešajte 10 sekund, nato pa na kratko centrifugirajte.
 - TCA1 – vibracijsko premešajte, nato na kratko centrifugirajte.
 - OPR1 – vibracijsko premešajte, nato na kratko centrifugirajte.
 - OPD2 – vibracijsko premešajte, nato na kratko centrifugirajte.

Postopek

1. Preglejte TCB1 glede oborine. Če je prisotna, ponovno segrejte epruveto in jo vibracijsko premešajte, dokler se kristali ne raztopijo.
2. V vsako vdolbinico s knjižnico na plošči ELU1 PCR dodajte 15 µl TCB1.
3. Dodajte 10 µl TCA1 v vsako vdolbinico s knjižnico.
4. V vsako vdolbinico dodajte isto sondo, ki ste jo uporabili med prvo hibridizacijo. Dodajte samo en nabor sond na vdolbinico.
Ne kombinirajte različnih tipov sond skupaj.
 - **[Vdolbinice s knjižnico RNK]** – Dodajte 5 µl OPR1 (rdeči pokrovček) v vsako knjižnico, pridobljeno iz RNK.

- **[Vdolbinice s knjižnico DNK]** – Dodajte 5 µl OPD2 (beli pokrovček) v vsako knjižnico, pridobljeno iz DNK.
- Na ploščo ELU1 PCR nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
 - 2 minuti stresajte pri 1200 vrt./min.
 - Postavite na ciklični termostat in zaženite program HYB2.
Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
 - Hibridizirajte pri 57 °C najmanj 1,5 ure do največ 4 ure.
 - Reagente za hibridizacijo vrnite v shrambo.

Zajem tarč dve

Ta korak uporablja SMB za zajem sond, hibridiziranih v tarčne regije zanimanja. Kroglice se enkrat sperejo z RSB. Obogatene knjižnice se eluirajo s svežo elucijsko mešanico EE2 + HP3 in nevtralizirajo z ET2.

Priprava

- Inkubator za mikrovzorke z vložkom grelnega bloka MIDI segrejte na 57 °C.
- Pripravite naslednje reagentne.
 - EE2 – premešajte z vrtinčenjem, nato na kratko centrifugirajte.
 - HP3 – vrtinčite, da premešate, nato na kratko centrifugirajte.
 - SMB – zagotovite, da bodo kroglice na sobni temperaturi 30 minut.
Za ta postopek uporabite **SMB** in ne SPB.
 - RSB – za uporabo v postopku ga dajte na stran.
 - ET2 – za uporabo v postopku ga dajte na stran.
- Pripravite svežo elucijsko mešanico EE2 + HP3 v mikrocentrifugirki.

Preglednica 30 Mešanica za elucijo EE2 + HP3 za zajem tarč dve*

Komponenta elucijske mešanice	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic	48 knjižnic
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Ta preglednica vključuje presežek količine. Za izračune glejte [Rokovanje z reagenti na strani 33](#).

- Vibracijsko premešajte, nato na kratko centrifugirajte. Postavite na stran za korak [Elucija na strani 65](#).
- Označite novo MIDI ploščo s 96 vdolbinicami CAP2 (zajem 2).
- Pripravite magnet.

Postopek

Vezava

1. Odstranite ploščo ELU1 PCR iz cikličnega termostata.
2. Ploščo ELU1 PCR centrifugirajte 1 minuto pri 280 × g.
3. Vibracijsko mešajte SMB 1 minuto, da se kroglice ponovno suspendirajo.
Če je prisotna oborina ali pelet kroglice, poskrbite, da bo dosežena sobna temperatura, pipetirajte, da se sprostijo pelet, nato pa vibracijsko premešajte, da se ponovno suspendira.
4. Takoj dodajte 150 µl SMB v vsako vdolbinico s knjižnico na plošči CAP2 MIDI.
Če se za razdeljevanje SMB uporablja korito, je treba pri alikvotiranju upoštevati faktor presežka 1,15, da se zagotovi zadostna količina materiala za vsak vzorec.
5. Po dodajanju SMB v vsako vdolbinico z vzorcem zavržite preostali material.
6. Nastavite pipeto na 50 µl in prenesite vso količino vsake knjižnice s plošče ELU1 PCR v ustrezno vdolbinico na plošči CAP2 MIDI.
7. Zavržite prazno ploščo ELU1 PCR.
8. Na ploščo CAP2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
9. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
10. Inkubirajte 25 minut v inkubatorju mikrovzorcev pri 57 °C.
Če nadaljujete s [Pomnoževanje obogatene knjižnice na strani 67](#), upoštevajte navodila za odtajanje reagentov v razdelku [Priprava na protokol](#).
11. Postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
12. Ploščo CAP2 MIDI obdržite na magnetnem stojalu. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.



POZOR

Takoj nadaljujte z naslednjim korakom ([Pranje na strani 64](#)). Ne dovolite, da bi bila kroglica dlje časa brez prisotnosti tekočine.

Pranje

1. Ploščo CAP2 MIDI odstranite z magnetnega stojala.
2. Obračajte ali vrtinčite RSB, da premešate.
3. Dodajte 200 µl RSB v vsako vdolbinico.
4. Na ploščo CAP2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
5. 4 minute stresajte pri 1800 vrt./min.
6. Ploščo postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.

7. Ploščo ohranite na magnetnem stojalu. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.
8. Uporabite pipeto s finimi konicami, da iz vsake vdolbinice odstranite preostali RSB.

Elucija

1. Ploščo CAP2 MIDI odstranite z magnetnega stojala.
2. Vibracijsko premešajte svežo mešanico za elucijo EE2 + HP3, nato na kratko centrifugirajte.
3. Dodajte 22 µl mešanice za elucijo EE2 + HP3 v vsako vdolbinico s knjižnico na plošči CAP2 MIDI.
4. Zavržite preostalo mešanico za elucijo EE2 + HP3.
5. Na ploščo CAP2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
6. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
7. Postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
8. Označite novo PCR ploščo s 96 vdolbinicami z ELU2 (elucija 2).
9. Vibracijsko premešajte ET2, nato na kratko centrifugirajte.
10. V vsako ustrezno vdolbinico s knjižnico na novi plošči ELU2 PCR dodajte 5 µl ET2.
11. Pazljivo prenesite 20 µl eluata iz vsake vdolbinice s knjižnico na plošči CAP2 MIDI v ustrezno vdolbinico na plošči ELU2 PCR.
12. Zavržite prazno ploščo CAP2 MIDI.
13. Na ploščo ELU2 PCR nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
14. 2 minuti stresajte pri 1200 vrt./min.
15. Vrnite SMB, EE2, HP3, RSB in ET2 v shrambo.

TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če boste postopek prekinili, centrifugirajte PCR ploščo ELU2 1 minuto pri 280 × g in jo shranite pri temperaturi od -25 °C do -15 °C za največ 7 dni.

Priprava na protokol

Ta priprava je potreba za izvajanje korakov protokola, ki vodijo do naslednje točke za varno zaustavitev.

1. Pripravite vedro z ledom ali podobno.
2. Odstranite epruvete z reagentom iz škatle in upoštevajte navodila za odtajanje.

Preglednica 31 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznjen) (št. dela 20031121)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
PPC3	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Pomnoževanje obogatene knjižnice

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
EPM	od -25 °C do -15 °C	Ohranjajte hladno.	Pomnoževanje obogatene knjižnice

Preglednica 32 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (hlajen) (št. dela 20031123)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
SPB (svetlo zelena oznaka)	od 2 °C do 8 °C	30 minut pustite pri sobni temperaturi.	Čiščenje ojačane in obogatene knjižnice
RSB	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Čiščenje ojačane in obogatene knjižnice Priprava na sekvenciranje

Pomnoževanje obogatene knjižnice

Ta korak uporablja začetnike za pomnoževanje obogatenih knjižnic.

Priprava

1. Če je bila plošča ELU2 shranjena, jo odtajajte na sobno temperaturo in nato 1 minuto centrifugirajte pri $280 \times g$.

Postopek

1. Premešajte PPC3 z vrtinčenjem in na kratko centrifugirajte.
2. Dodajte 5 µl PPC3 v vsako vdolbinico s knjižnico na plošči ELU2 PCR.
3. Vrtinčite EPM 5 sekund, da premešate, nato pa na kratko centrifugirajte.
4. Dodajte 20 µl EPM v vsako vdolbinico s knjižnico.
5. Na ploščo ELU2 PCR nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
6. 2 minuti stresajte pri 1200 vrt./min.
7. Postavite na ciklični termostat in zaženite program EL-PCR.
Glejte [Programiranje cikličnega termostata na strani 41](#).
Če nadaljujete z [Normalizacija knjižnic na strani 70](#), upoštevajte navodila za odtajanje v razdelku [Priprava na protokol](#).
8. Vrnite PPC3 in EPM v shrambo.

Čiščenje ojačane in obogatene knjižnice

Ta korak uporablja SPB za čiščenje obogatenih knjižnic neželenih reakcijskih komponent. Kroglice se dvakrat sperejo s svežim 80-odstotnim etanolom. Knjižnice se eluirajo z RSB.

Priprava

1. Pripravite naslednje reagentne.
 - SPB – poskrbite, da bodo kroglice pri sobni temperaturi 30 minut. Za ta postopek uporabite **SPB** in ne **SMB**.
 - RSB – za uporabo v postopku ga dajte na stran.
2. Pripravite svež 80-odstotni etanol v konični epruveti z volumnom 15 ml ali 50 ml.

Preglednica 33 Pripravite svež 80-odstotni etanol.

Reagent	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic	48 knjižnic
100-odstotni EtOH, čist	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Vibracijsko premešajte 80-odstotni EtOH.
4. Označite novo MIDI ploščo s 96 vdolbinicami z BIND2 (čistilna vezava).
5. Pripravite magnet.

Postopek

Vezava

1. Odstranite ploščo ELU2 PCR iz cikličnega termostata.
2. Ploščo ELU2 PCR centrifugirajte 1 minuto pri $280 \times g$.
3. Vibracijsko mešajte SPB 1 minuto, da se kroglice ponovno suspendirajo.
4. Takoj dodajte 110 µl SPB v vsako vdolbinico s knjižnico na plošči BIND2 MIDI.
5. Prenesite 50 µl vsake knjižnice s plošče ELU2 PCR v ustrezno vdolbinico na plošči BIND2 MIDI.
6. Zavržite prazno ploščo ELU2 PCR.
7. Na ploščo BIND2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
8. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
9. Pri sobni temperaturi inkubirajte 5 minut.
10. Ploščo BIND2 MIDI postavite na magnetno stojalo za 5 minut.
11. Ploščo ohranite na magnetnem stojalu. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.

Pranje

1. Kroglice operite na naslednji način.
 - a. Ploščo BIND2 MIDI imejte na magnetnem stojalu in v vsako vdolbinico dodajte 200 µl svežega 80-odstotnega EtOH.
 - b. Počakajte 30 sekund.
 - c. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.
2. **Ponovno** operite kroglice (drugič).
3. Uporabite pipeto s finimi konicami, da iz vsake vdolbinice odstranite preostali EtOH.
4. Zavržite neuporabljen 80-odstotni EtOH.

Elucija

1. Ploščo BIND2 MIDI odstranite z magnetnega stojala.
2. Obračajte ali vibracijsko premešajte RSB.
3. Dodajte 32 µl RSB v vsako vdolbinico s knjižnico.
4. Na ploščo BIND2 MIDI nanesite samolepilno folijo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
5. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
6. Pri sobni temperaturi inkubirajte 2 minuti.
7. Postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
8. Označite novo ploščo PCR s 96 vdolbinicami s PL (Purified Libraries – prečiščene knjižnice).
9. Prenesite 30 µl vsakega eluata s plošče BIND2 MIDI v ustrezno vdolbinico na plošči PL PCR.
10. Zavržite prazno ploščo BIND2 MIDI.
11. Na ploščo PL PCR nanesite samolepilno folijo.
12. Vrnite SPB in RSB v skladišče.

TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če boste postopek prekinili, centrifugirajte PCR ploščo PL 1 minuto pri 280 × g in jo shranite pri temperaturi od -25 °C do -15 °C za največ 30 dni.

Priprava na protokol

Ta priprava je potrebna za izvajanje korakov protokola, ki vodijo do naslednje točke za varno zaustavitev.

1. Odstranite epruvete z reagentom iz škatle in upoštevajte navodila za odtajanje.

Preglednica 34 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznjen) (št. dela 20031121)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
LNA1	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Normalizacija knjižnic
EE2	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite do sobne temperature.	Normalizacija knjižnic

Preglednica 35 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (hlajen) (št. dela 20031123)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
LNB1	od 2 °C do 8 °C	30 minut pustite pri sobni temperaturi.	Normalizacija knjižnic
HP3	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Normalizacija knjižnic Priprava na sekvenciranje

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
LNW1	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Normalizacija knjižnic
LNS1	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Normalizacija knjižnic

2. Če nadaljujete isti dan s [Priprava na sekvenciranje na strani 73](#), upoštevajte navodila za odtajanje v razdelku [Priprava na protokol](#).

Normalizacija knjižnic

Ta postopek uporablja dodatke LNB1 plus (LNA1) za normalizacijo količine vsake knjižnice, da se zagotovi enotna predstavitev knjižnice v združenih knjižnicah. Kroglice se dvakrat sperejo z LNW1. Knjižnice se eluirajo s svežo elucijsko mešanico EE2 + HP3 in nevtralizirajo z LNS1.

Priprava

- Pripravite naslednje reagente.
 - LNB1 – poskrbite, da bodo kroglice pri sobni temperaturi 30 minut.
 - LNA1 – premešajte z vrtinčenjem.
 - EE2 – premešajte z vrtinčenjem, nato na kratko centrifugirajte.
 - HP3 – vrtinčite, da premešate, nato na kratko centrifugirajte.
 - LNW1 – premešajte z vrtinčenjem. Za uporabo v postopku ga dajte na stran.
 - LNS1 – premešajte z vrtinčenjem. Za uporabo v postopku ga dajte na stran.
- Z vrtinčenjem mešajte LNB1 1 minuto, da se kroglice resuspendirajo. Obračajte epruveto LNB1 in se prepričajte, da so vse kroglice resuspendirane.
- S pipeto, nastavljeno na 800 µl, 10-krat pipetirajte LNB1 navzgor in navzdol, da zagotovite resuspendiranje.
- Takoj pripravite svežo osnovno mešanico LNA1 + LNB1 v konični epruveti.



POZOR

Popolnoma resuspendirajte peleton kroglic LNB1 na dnu epruvete, da preprečite neskladno gostoto gruč.

Preglednica 36 Osnovna mešanica LNA1 + LNB1*

Komponenta osnovne mešanice	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic	48 knjižnic
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Ta preglednica vključuje presežek količine. Za izračune glejte [Rokovanje z reagenti na strani 33](#).

5. Z vrtinčenjem premešajte osnovno mešanico LNA1 + LNB1. Postavite na stran za korak [Vezava na strani 71](#).
6. Pripravite svežo elucijsko mešanico EE2 + HP3 v mikrocentrifugirki.

Preglednica 37 Elucijska mešanica EE2 + HP3 za normalizacijo knjižnic*

Komponenta elucijske mešanice	4 knjižnice	8 knjižnic	16 knjižnic	24 knjižnic	48 knjižnic
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Ta preglednica vključuje presežek količine. Za izračune glejte [Rokovanje z reagenti na strani 33](#).

7. Svežo elucijsko mešanico vrtinčite in na kratko centrifugirajte. Postavite na stran za korak [Eluiranje na strani 72](#).
8. Če je bila plošča PL PCR shranjena, jo odtajajte na sobno temperaturo in nato 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g. Pipetirajte, da se premeša.
9. Označite novo MIDI ploščo s 96 vdolbinicami z BBN (Bead-Based Normalization – normalizacija na osnovi kroglic).
10. Pripravite magnet.

Postopek

Vezava

1. Vrtinčite osnovno mešanico LNA1 + LNB1.
2. Takoj dodajte 45 µl osnovne mešanice LNA1 + LNB1 v vsako vdolbinico knjižnice na plošči BBN MIDI.
3. Zavrzite preostalo osnovno mešanico LNA1 + LNB1.
4. Dodajte 20 µl vsake knjižnice s plošče PL PCR v ustrezno vdolbinico na plošči BBN MIDI.
5. Na ploščo BBN MIDI nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
6. 30 minut stresajte pri 1800 vrt./min.
7. Na ploščo PL PCR nanesite samolepilno tesnilo in jo vrnite v shrambo.
8. Ploščo BBN MIDI postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
9. Ploščo ohranite na magnetnem stojalu. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice odstranite in zavrzite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.

Pranje

1. Kroglice operite na naslednji način.
 - a. Ploščo BBN MIDI odstranite z magnetnega stojala.
 - b. Dodajte 45 µl LNW1 v vsako vdolbinico s knjižnico.
 - c. Na ploščo BBN MIDI nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.

- d. 5 minut stresajte pri 1800 vrt./min.
 - e. Ploščo BBN MIDI postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
 - f. Ploščo ohranite na magnetnem stojalu. S pipeto, nastavljeno na 200 µl, iz vsake vdolbinice odstranite in zavržite ves supernatant, pri čemer se ne dotikajte pelet kroglic.
2. *Ponovno* operite kroglice (drugič).
 3. Uporabite pipeto s finimi konicami, da iz vsake vdolbinice odstranite preostali supernatant.

Eluiranje

1. Ploščo BBN MIDI odstranite z magnetnega stojala.
2. Vibracijsko premešajte svežo mešanico za elucijo EE2 + HP3, nato na kratko centrifugirajte.
3. Dodajte 32 µl raztopine EE2 + HP3 v vsako vdolbinico s knjižnico na plošči BBN MIDI.
4. Zavržite preostalo elucijsko mešanico.
5. Na ploščo BBN MIDI nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
6. 2 minuti stresajte pri 1800 vrt./min.
7. Postavite na magnetno stojalo za 2 minuti.
8. Označite novo PCR ploščo s 96 vdolbinicami z NL (normalizirane knjižnice).
9. Pazljivo prenesite 30 µl eluata iz vsake vdolbinice s knjižnico na plošči BBN MIDI v ustrezno vdolbinico na plošči NL PCR.



POZOR

Če se kroglice aspirirajo v pipetne konice, jih vrnite v ploščo na magnetnem stojalu in počakajte, da se tekočina zbistri (~2 minuti), preden nadaljujete z naslednjim korakom v postopku.

10. Zavržite prazno ploščo BBN MIDI.
11. Premešajte LNS1 z vrtinčenjem.
12. V vsako vdolbinico s knjižnico na novi plošči NL PCR dodajte 30 µl LNS1.
13. Pipetirajte petkrat, da se premeša.
14. Na ploščo NL PCR nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
15. Vrnite LNB1, LNA1, EE2, LNW1 in LNS1 v shrambo.

TOČKA ZA VARNO ZAUSTAVITEV

Če boste postopek prekinili, centrifugirajte ploščo NL PCR 1 minuto pri $280 \times g$ in jo shranite pri temperaturi od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ za največ 32 dni.

Priprava na protokol

Ta priprava je potrebna za izvajanje korakov protokola, ki vodijo do sekvenciranja.

Vsaj eno uro pred uporabo začnite s pripravo potrošnega materiala za sekvenciranje iz kompleta NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklov) (št. dela 20028871)

1. Premaknite pufer za redčenje knjižnice (HT1) iz shrambe –25 °C na –15 °C. Odmrznite do sobne temperature. Po odtajanju shranite na hladnem.
2. Pri drugem potrošnem materialu v kompletu upoštevajte navodila za pripravo v *Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513)*.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklov)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 ciklov)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 ciklov)
3. Odstranite epruvete z reagentom iz škatle in upoštevajte navodila za odtajanje.

Preglednica 38 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznjen) (št. dela 20031121)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
PhiX Internal Control (PX3 ali PhiX)	od –25 °C do –15 °C	Odmrznite do sobne temperature. Po odtajanju shranite na hladnem.	Priprava na sekvenciranje

Preglednica 39 Škatla TruSight Oncology Comp Enrichment (shranjujte v hladilniku) (št. dela 20031123)

Reagent	Shranjevanje	Navodila za odtajanje	Korak protokola
HP3	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Priprava na sekvenciranje
RSB (rožnata oznaka)	od 2 °C do 8 °C	Segrejte na sobno temperaturo.	Priprava na sekvenciranje

Priprava na sekvenciranje

Vsaka izvedba sekvenciranja DNK in RNK mora vključevati pozitivno kontrolo in NTC. NTC za DNK in RNK se po potrebi sekvencirajo večkrat, tako da vsak cikel vsebuje NTC. Vsak cikel DNK in RNK vključuje ločeno pozitivno kontrolo.

Priprava

1. Preglejte smernice v razdelku [Število knjižnic in izbor indeksov na strani 35](#).
2. Označite mikrocentrifugirko dHP3 (redčen HP3).

3. Označite mikrocentrifugirko dPhiX (redčen PhiX).
4. Toplotni blok za mikrocentrifugirke segrejte na 96 °C.
5. Pripravite vedro z ledom ali podobno.

Redčenje in denaturacija kontrole PhiX

1. Vrtinčite HP3, da premešate, nato pa na kratko centrifugirajte.
2. V mikrocentrifugirki dHP3 združite naslednje volumne.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Vrtinčite dHP3, da premešate, nato pa na kratko centrifugirajte.
4. Obračajte ali vrtinčite RSB, da premešate.
5. Premešajte kontrolo PhiX z vrtinčenjem in na kratko centrifugirajte.
6. V mikrocentrifugirki dPhiX združite naslednje volumne.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl kontrole PhiX
7. V epruveto dPhiX dodajte 10 µl dHP3.
8. Zavrzite epruveto dHP3.
9. Vrtinčite epruveto dPhiX in jo nato na kratko centrifugirajte.
10. Pri sobni temperaturi inkubirajte dPhiX 5 minut, da denaturira.
11. Premešajte HT1 z vrtinčenjem.
12. Takoj dodajte 980 µl predhodno pripravljenega HT1 v dPhiX.
13. Premešajte z vrtinčenjem in na kratko centrifugirajte.
14. PhiX naj bo hladen, dokler ga ne uporabite v pripravi na drugo redčenje.
Končna koncentracija je 20 pM dPhiX.
15. Vrnite PhiX, HP3 in RSB v shrambo.

Združevanje in denaturacija knjižnic za TSO Comprehensive (EU)

1. Če je bila plošča NL PCR shranjena, jo odtajajte na sobno temperaturo in nato 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g.
2. Z večkanalno pipeto, nastavljeno na 30 µl, petkrat nežno premešajte s pipetiranjem knjižnice na plošči NL PCR.
Uporabite sveže konice za vsako knjižnico.



POZOR

Knjižnice dobro premešajte za optimalno delovanje.

3. Izberite eno od naslednjih možnosti za združevanje, denaturiranje in redčenje knjižnic.

- **[Možnost 1]** Sekvencirajte knjižnice, pridobljene iz vzorcev RNK in vzorcev DNK hkrati. Glejte [Možnost 1: Skupne DNK- in RNK-knjižnice na strani 75](#).
- **[Možnost 2]** Sekvencirajte knjižnice, pridobljene samo iz vzorcev DNK. Glejte [Možnost 2: Samo knjižnice DNK na strani 76](#).
- **[Možnost 3]** Sekvencirajte knjižnice, pridobljene samo iz vzorcev RNK. Glejte [Možnost 3: Samo knjižnice RNK na strani 77](#).

Možnost 1: Skupne DNK- in RNK-knjižnice

1. Označite mikrocentrifugirko PRL (združene knjižnice RNK).
2. Označite mikrocentrifugirko PDL (združene knjižnice DNK).
3. Prenesite 10 µl vsake normalizirane knjižnice RNK (cDNK) s plošče NL v epruveto PRL.
Ne združite dveh knjižnic z istim indeksnim začetnim oligonukleotidom.
4. Prenesite 10 µl vsake normalizirane knjižnice DNK s plošče NL v epruveto PDL.
Ne združite dveh knjižnic z istim indeksnim začetnim oligonukleotidom.
5. Na ploščo NL PCR nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
6. Vrtinčite epruvete PRL in PDL, da jih premešate.
7. Na kratko centrifugirajte epruvete PRL in PDL.
8. Dve minuti inkubirajte epruvete PRL in PDL v toplotnem bloku pri 96 °C.
9. Epruvete PRL in PDL naj bodo 5 minut na hladnem.
10. Vrtinčite epruvete PRL in PDL, da jih premešate, nato pa jih na kratko centrifugirajte.
11. Epruvete PRL in PDL naj bodo na hladnem.

Pripravite prvo redčenje

1. Označite mikrocentrifugirko DIL1 (redčenje 1).
2. Prenesite 20 µl PDL v prazno epruveto DIL1.
3. V epruveto DIL1 dodajte 5 µl PRL.
4. Zavrzite epruvete PDL in PRL.
5. Epruveti DIL1 dodajte 475 µl predhodno ohlajenega HT1 (redčenje 1 : 20).
6. Vrtinčite epruveto DIL1 in jo nato na kratko centrifugirajte.

Priprava drugega redčenja

1. Označite 2,0-mililitrsko mikrocentrifugirko DIL2 (redčenje 2).
2. Prenesite 40 µl DIL1 v prazno epruveto DIL2.
3. Zavrzite epruveto DIL1.

4. V epruveto DIL2 dodajte 1660 µl predhodno ohlajenega HT1 (redčenje 1 : 850).
5. Vrtinčite 20 pM dPhiX, da premešate, nato na kratko centrifugirajte.
6. V epruveto DIL2 dodajte 2,5 µl pripravljenega 20 pM dPhiX.
7. Premešajte z vrtinčenjem in na kratko centrifugirajte.
8. Napolnite 1300 µl DIL2 v odmrznjeno kartušo NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklov).
Za več informacij glejte *Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513)*.
9. Zavrzite epruveto DIL2.
10. Ploščo NL PCR 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g, nato pa jo do 32 dni hranite pri –25 °C do –15 °C.
11. Nadaljujte s sekvenciranjem.
Za več informacij glejte *Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513)*.

Možnost 2: Samo knjižnice DNK

1. Označite mikrocentrifugirko s PDL (združene knjižnice DNK).
2. Prenesite 10 µl vsake normalizirane knjižnice DNK s plošče NL v epruveto PDL.
Ne združite dveh knjižnic z istim indeksnim začetnim oligonukleotidom.
3. Na ploščo NL PCR nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice.
4. Vibracijsko premešajte epruveto PDL, nato pa jo na kratko centrifugirajte.
5. Inkubirajte epruveto PDL dve minuti v toplotnem bloku pri 96 °C.
6. Epruveta PDL naj bo 5 minut na hladnem.
7. Vibracijsko premešajte epruveto PDL, nato pa jo na kratko centrifugirajte.
8. Epruveto PDL hranite na hladnem.

Pripravite prvo redčenje

1. Označite mikrocentrifugirko DIL1 (redčenje 1).
2. Prenesite 10 µl PDL v prazno epruveto DIL1.
3. Zavrzite epruveto PDL.
4. Epruveti DIL1 dodajte 190 µl predhodno ohlajenega HT1 (redčenje 1 : 20).
5. Vrtinčite epruveto DIL1 in jo nato na kratko centrifugirajte.

Priprava drugega redčenja

1. Označite 2,0-mililitrsko mikrocentrifugirko DIL2 (redčenje 2).
2. Prenesite 40 µl DIL1 v prazno epruveto DIL2.
3. Zavrzite epruveto DIL1.

4. V epruveto DIL2 dodajte 1660 µl predhodno ohlajenega HT1 (redčenje 1 : 850).
5. Vibracijsko premešajte pripravljeni 20 pM dPhiX, nato na kratko centrifugirajte.
6. V epruveto DIL2 dodajte 2,5 µl pripravljenega 20 pM dPhiX.
7. Premešajte z vrtnčenjem in na kratko centrifugirajte.
8. Napolnite 1300 µl DIL2 v odmrznjeno kartušo NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklov).
Za več informacij glejte *Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513)*.
9. Zavržite epruveto DIL2.
10. Ploščo NL PCR 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g, nato pa jo do 32 dni hranite pri –25 °C do –15 °C.
11. Nadaljujte s sekvenciranjem.
Za več informacij glejte *Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513)*.

Možnost 3: Samo knjižnice RNK

1. Označite mikrocentrifugirko PRL (združene knjižnice RNK).
2. Prenesite 10 µl vsake normalizirane knjižnice RNK (cDNK) s plošče NL v epruveto PRL.
Ne združite dveh knjižnic z istim indeksnim začetnim oligonukleotidom.
3. Na ploščo NL PCR nanesite samolepilno tesnilo.
V celoti zatesnite robove in vdolbinice, da preprečite izhlapevanje.
4. Premešajte epruveto PRL z vrtnčenjem.
5. Na kratko centrifugirajte epruveto PRL.
6. Inkubirajte epruveto PRL dve minuti v toplotnem bloku pri 96 °C.
7. Epruveta PRL naj bo 5 minut na hladnem.
8. Vrtinčite epruveto PRL in jo nato na kratko centrifugirajte.
9. Epruveto PRL hranite na hladnem.

Pripravite prvo redčenje

1. Označite mikrocentrifugirko DIL1 (redčenje 1).
2. Prenesite 10 µl PRL v prazno epruveto DIL1.
3. Zavržite epruveto PRL.
4. Epruveti DIL1 dodajte 190 µl predhodno ohlajenega HT1 (redčenje 1 : 20).
5. Vrtinčite epruveto DIL1 in jo nato na kratko centrifugirajte.

Priprava drugega redčenja

1. Označite 2,0-mililitrsko mikrocentrifugirko DIL2 (redčenje 2).
2. Prenesite 40 µl DIL1 v prazno epruveto DIL2.

3. Zavržite epruveto DIL1.
4. V epruveto DIL2 dodajte 1646 µl predhodno ohlajenega HT1 (redčenje 1 : 843).
5. Vibracijsko premešajte pripravljeni 20 pM dPhiX, nato na kratko centrifugirajte.
6. V epruveto DIL2 dodajte 16,7 µl pripravljenega 20 pM dPhiX.
7. Premešajte z vrtničenjem in na kratko centrifugirajte.
8. Napolnite 1300 µl DIL2 v odmrznjeno kartušo NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklov).
Za več informacij glejte *Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513)*.
9. Zavržite epruveto DIL2.
10. Ploščo NL PCR 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g, nato pa jo hranite pri –25 °C do –15 °C do 32 dni.
11. Nadaljujte s sekvenciranjem.
Za več informacij glejte *Referenčna navodila za NextSeq 550Dx instrument (dokument št. 1000000009513)*.

Interpretacija rezultatov

Rezultati sekvenciranja iz testa TSO Comprehensive (EU) so za vsak vzorec posebej poročani v poročilu PDF in poročilu JSON. Na ravni vzorca se ustvari tudi poročilo o nizki globini (`LowDepthReport.tsv`).

Na ravni izvedbe se ustvarijo naslednje izhodne datoteke:

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

V poročilih PDF in JSON so prikazane samo variante, ki so prestale kontrolo kakovosti.

Za podrobne informacije o analizi glejte *Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661)*.

Rezultati spremljevalne diagnostike

Za vsako spremljevalno diagnostiko (CDx) so možni trije rezultati:

- **Positive** (Pozitivno) – zaznana je varianta ali biološki označevalec in razvrščena kot raven 1 (CDx).
- **Not detected** (Ni zaznano) – v vzorcu niso zaznane nobene variante ali biološki označevalci, povezani s predvideno uporabo CDx. Vrsta tumorja, izbrana za vzorec, je primerna za CDx.
- **No result** (Ni rezultata) – določitev stanja variante ni mogoča iz enega ali več naslednjih razlogov:
 - Predvidena uporaba CDx ni primerna za testirani vzorec, ker vrsta tumorja, izbrana za vzorec, ni primerna za vrsto tumorja za CDx.
 - Specifikacije kontrole kakovosti v izvedbi sekvenciranja niso bile dosežene.
 - Knjižnica ni izpolnila zahtevanih specifikacij za kontrolo kakovosti.
 - Ustrezna nukleinska kislina ni bila analizirana.

Vsi rezultati predvidene uporabe CDx so navedeni v razdelku Rezultati spremljevalne diagnostike v poročilu JSON. V razdelku Rezultati spremljevalne diagnostike v poročilu PDF so navedene samo predvidene uporabe s pozitivnim rezultatom.

Variante profiliranja tumorja

TSO Comprehensive (EU) je zasnovan tako, da poroča o somatskih variantah pri poročanju o variantah z dokazi o klinični pomembnosti oziroma variantah z morebitno klinično pomembnostjo. Programska oprema za test TSO Comprehensive (EU) uporablja KB, ki določa, ali je vsaka zaznana in ustrezna varianta ([Preglednica 2](#)) klinično pomembna ali potencialno klinično pomembna na podlagi dokazov terapevtskih, diagnostičnih ali prognostičnih povezav. KB prav tako upošteva, ali so v testirani vrsti tumorja vzpostavljene povezave (ali ne). Povezave z občutljivostjo ali tveganjem za rak niso vključene v KB. Običajni polimorfizmi se odstranijo.

Pri variantah profiliranja tumorja so pozitivni rezultati razvrščeni v genomske ugotovitve z dokazi o klinični pomembnosti (raven 2) oziroma genomske ugotovitve z morebitno klinično pomembnostjo (raven 3) glede na nameščeno KB in ugotovljeno vrsto tumorja.

Neuspešne kontrole kakovosti ne pripeljejo do rezultatov za vrste variant, ki so pomembne za metriko neuspešne kontrole kakovosti. Za več informacij glejte [Preglednica 40](#) in [Preglednica 41](#). Položaji profiliranja tumorja z nezadostno globino so navedeni v poročilu o majhni globini in ne v poročilu TSO Comprehensive (EU).

Kontrola kakovosti

- Za informacije o kvantifikaciji nukleinske kisline in minimalne zahteve glede vhodnega materiala glejte [Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27](#).
- Izvedba sekvenciranja in veljavnost vzorca se določita samodejno in ju sporoči Modul za analizo TSO Comprehensive (EU). Za podrobne informacije o analizi glejte *Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661)*.
- Poročilo TSO Comprehensive (EU), ki je na voljo v obliki PDF in JSON, povzema rezultate kontrole kakovosti. Datoteke poročil so v mapi analize. Za mesto mape analize (vsebuje poročila PDF in JSON) in mapo izvedbe glejte *Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661)*.

Preglednica 40 Poročilo o metriki KK za TSO Comprehensive (EU)

Vrsta izhoda	Metrika	Specifikacija	Opis	Vpliv neizpolnjevanja specifikacije*
Izvedba sekvenciranja	PCT_PF_READS (%)	$\geq 80,0$	Odstotek odčitkov, ki so prešli skozi filter (PF).	Izvedba sekvenciranja razveljavljena. Za noben vzorec v izvedbi ni poročila o rezultatih.
	PCT_Q30_R1 (%)	$\geq 80,0$	Povprečni odstotek določitev baz z rezultatom kakovosti Q30 ali več za Odčitavanje 1.	Izvedba sekvenciranja razveljavljena. Za noben vzorec v izvedbi ni poročila o rezultatih.
	PCT_Q30_R2 (%)	$\geq 80,0$	Povprečni odstotek določitev baz z rezultatom kakovosti Q30 ali več za Odčitavanje 2.	
Knjižnice DNK	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 ALI > 3106 IN P_ VALUE $\leq$ 0,049	Metrika, ki ocenjuje verjetnost kontaminacije z uporabo VAF pogostih variant. Ocena kontaminacije temelji na porazdelitvi VAF za SNP. Vrednost P za kontaminacijo se uporablja za oceno zelo preurejenih genomov. Uporabi se samo, če je ocena kontaminacije nad zgornjo mejo specifikacije.	Ni poročil o rezultatih DNK.

Vrsta izhoda	Metrika	Specifikacija	Opis	Vpliv neizpolnjevanja specifikacije*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Mediana dolžine fragmenta v vzorcu.	Ni poročil o rezultatih TMB ali majhnih variant DNK.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (count)	≥ 150	Mediana pokritosti fragmentov eksona za vse baze eksona.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Odstotek baz eksona s 50-kratno pokritostjo fragmentov.	
	USABLE_MSI_SITES (count)	≥ 40	Število mest MSI, uporabnih za določanje MSI (število mikrosatelitnih mest z zadostnim obsegom odčitkov za prepoznavanje mikrosatelitne nestabilnosti).	Ni poročil o rezultatih MSI.
	COVERAGE_MAD (count)	$\leq 0,210$	Mediana absolutnih odstopanj od mediane normaliziranega števila vsakega tarčnega območja CNV.	Ni poročil o rezultatih pomnožitve genov.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (število)	$\geq 1,0$	Mediana števila neobdelanega števila binov na tarčo CNV.	
Knjižnice RNK	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Mediana dolžine fragmenta v vzorcu.	Ni poročil o rezultatih fuzij ali spojitvenih variant.

Vrsta izhoda	Metrika	Specifikacija	Opis	Vpliv neizpolnjevanja specifikacije*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeficient)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X je merilo enakomernosti pokritosti. Za vsak gen z vsaj 500-kratno pokritostjo se izračuna koeficient variacije pokritosti po telesu gena. Ta metrika je mediana teh vrednosti. Velika vrednost pomeni visoko raven variacije in kaže na težavo pri pripravi knjižnice, kot so majhen vhodni vzorec in/ali težave z izvlečkom (pulldown) s sondo. Ta metrika se izračuna z uporabo vseh odčitkov (vključno z odčitki, označenimi kot dvojniki).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (št.)	$\geq 9.000.000$	Skupno število odčitkov, ki se preslikajo na tarčna območja. Ta metrika se izračuna z uporabo vseh odčitkov (vključno z odčitki, označenimi kot dvojniki).	

* Uspešni rezultati so prikazani kot PASS (USPEŠNO).

Preglednica 41 Poročilo o metriki kontrole kakovosti za TSO Comprehensive (EU)

Vrsta izhoda	Metrika	Specifikacija	Vpliv neizpolnjevanja specifikacije*
Pozitivna kontrola	Zunanja kontrola DNK	Zaznanih je 23 od 24 navedenih variant	Ročno razveljavite vzorce bolnikov na podlagi rezultatov kontrolnega vzorca. Na podlagi rezultatov kontrolnega vzorca programska oprema modula za analizo ne razveljavi samodejno bolnikovih vzorcev.
	Zunanja kontrola RNK	Zaznanih je 12 od 13 navedenih variant	
Kontrola brez predloge	Mediana pokritosti eksona DNK za test TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Ročno razveljavite vzorce bolnikov na podlagi rezultatov kontrolnega vzorca. Na podlagi rezultatov kontrolnega vzorca programska oprema modula za analizo ne razveljavi samodejno bolnikovih vzorcev.
	RNA gen nad mediano mejne vrednosti	≤ 1	

* Uspešni rezultati so prikazani kot PASS (USPEŠNO).

- Ponovite izvedbe sekvenciranja, ki so neveljavne.
- Ponovite testiranja knjižnic z naslednjimi rezultati:
 - Kontaminirane knjižnice DNK
 - Neveljavne knjižnice RNK
 - Teste je mogoče ponoviti, da bi dobili več rezultatov variant ali bioloških označevalcev za knjižnice DNK, ki so bile razveljavljene za eno, vendar ne za vse vrste variant.
- Pozitivne kontrole se ocenijo za določanje variant. Če pozitivne kontrole ne ustrezajo specifikacijam za določanje variant, ročno razveljavite izvedbo sekvenciranja. Na podlagi rezultatov kontrolnega vzorca programska oprema modula za analizo ne razveljavi samodejno bolnikovih vzorcev.
- NTC se ocenjujejo glede na mediano pokritosti eksona za DNK in gene nad mediano mejne vrednosti za RNK. Če negativne kontrole ne ustrezajo specifikacijam, ročno razveljavite dogodek priprave knjižnice in vse povezane izvedbe sekvenciranja. Na podlagi rezultatov kontrolnega vzorca programska oprema modula za analizo ne razveljavi samodejno bolnikovih vzorcev.
- Izvedite dodatne ukrepe za kontrolo kakovosti v skladu z lokalnimi, državnimi in/ali zveznimi predpisi ali zahtevami za akreditacijo.

Za več informacij o ponovitvi izvedbe sekvenciranja ali testiranja knjižnic glejte [Odpravljanje težav na strani 84](#).

Odpravljanje težav

Za odpravljanje težav v poteku dela uporabite naslednjo preglednico. Če je izvedba sekvenciranja ali priprave knjižnic za vzorec dvakrat zapored neuspešna, je potrebno dodatno odpravljanje težav. Obrnite se na tehnično podporo družbe Illumina.

Opažanje	Možni vzrok	Priporočen ukrep
Sekvenciranje ne izpolnjuje navedenih meril kontrole kakovosti.	- Napaka pri združevanju - Napaka pri redčenju - Nepopolna toplotna denaturacija PRL/PDL - Težave s pripravo potrošnega materiala za sekvenciranje (na primer ni ustrezno odtaljen, kondenzacija/nečistoče na pretočni celici)	Ponovno sekvencirajte knjižnice iz PCR-plošče normalizirane knjižnice (NL). Glejte Priprava na sekvenciranje na strani 73.
	- Nepravilna uporaba sond za obogatitev (na primer sond OPR1, ki se uporabljajo za vzorce DNK, sond OPD2, ki se uporabljajo za vzorce RNK) - Napaka v poteku dela priprave knjižnice med prvim korakom hibridizacije ali po njem.	Ponovite korake obogatitve za knjižnice iz PCR-plošče z vzorci s pomnoženimi knjižnicami (ALS). Glejte Nastavitev prve hibridizacije na strani 57 .
	Zahteve za vnos vzorcev niso bile izpolnjene	S pripravo knjižnic začnite od začetka poteka dela. Glejte Denaturacija in prileganje RNK na strani 43 oziroma Fragmentiranje gDNK na strani 48 .
	Napaka v poteku dela priprave knjižnice med ali pred korakom indeksne PCR	Ponovite korake obogatitve za knjižnice iz PCR-plošče z vzorci s pomnoženimi knjižnicami (ALS). Glejte Nastavitev prve hibridizacije na strani 57 .
	Težava z instrumentom	Obrnite se na tehnično podporo družbe Illumina.

Opažanje	Možni vzrok	Priporočen ukrep
Napaka pri ustvarjanju poročila ali splošna napaka instrumenta (napaka omrežja, napake pri nalaganju/odstranjevanju reagentov itd.).	Težave s programsko opremo ali instrumentom.	Za pomoč pri ustvarjanju poročil glejte Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661). Za dodatno pomoč se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina.
Knjižnica DNK ni v skladu s specifikacijami kontrole kakovosti.	Zahteve za vnos vzorcev niso bile izpolnjene.	Zagotovite ustrezen vnos vzorca in ponovite pripravo knjižnice od koraka fragmentiranja gDNK. Glejte Zahteve glede vzorca na strani 26 in Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27 .
	Napaka pri uporabi ali napaka laboratorijske opreme v poteku dela s testom.	Ponovite pripravo knjižnic od enega od naslednjih korakov, odvisno od tega, kje je prišlo do domnevne ali dejanske napake opreme. Če je prišlo do neznane ali druge napake, se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina, ki vam bo pomagala odpraviti težavo pri izvedbi postopka. - Ponovno sekvencirajte knjižnice iz PCR-plošče normalizirane knjižnice (NL). Glejte Priprava na sekvenciranje na strani 73. - Ponovite korake obogatitve za knjižnice iz PCR-plošče z vzorci s pomnoženimi knjižnicami (ALS). Glejte Nastavitev prve hibridizacije na strani 57. - S pripravo knjižnic začnite od začetka poteka dela. Glejte Fragmentiranje gDNK na strani 48.
	Merila CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE (OCENA_KONTAMINACIJE, P_VREDNOST_KONTAMINACIJE) niso izpolnjena.	Preglejte opozorila in previdnostne ukrepe za informacije o preprečevanju navzkrižne kontaminacije. Preglejte postavitev plošče in indeksiranje knjižnic ter se prepričate, da niso bile hkrati sekvencirane knjižnice istega indeksa. Pri prizadetih knjižnicah začnite s pripravo knjižnic od začetka poteka dela. Glejte Fragmentiranje gDNK na strani 48 . Do kontaminacije je lahko prišlo med ekstrakcijo vzorca. Morda bo treba ponoviti ekstrakcijo in tako zagotoviti, da je vzorec brez kontaminacije.

Opažanje	Možni vzrok	Priporočen ukrep
	Uporabni MSI nepravilen.	Preglejte nastavitve proizvajalca ultrazvočne naprave za uporabo in delovanje (vključno z nivojem vode in vrsto epruvete). Zagotovite ustrezen vnos vzorca v test. Glejte Zahteve glede vzorca na strani 26 in Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27. Če je vzorec prekomerno fragmentiran ali poškodovan, bo morda potrebna nova ekstrakcija vzorca in/ali ponovitev koraka fragmentiranja gDNK.
	Vzorec je prekomerno fragmentiran ali ima poškodbe nukleinske kisline, ki vplivajo na sposobnost ustvarjanja zadostnih edinstvenih knjižnic.	Preglejte Nastavitve konfiguracije ultrazvočne naprave za fragmentacijo DNK na strani 22 in nastavitve proizvajalca ultrazvočne naprave za uporabo in delovanje (vključno z nivojem vode in vrsto epruvete). Zagotovite ustrezen vnos vzorca v test. Glejte Zahteve glede vzorca na strani 26 in Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27. Če je vzorec prekomerno fragmentiran ali poškodovan, bo morda potrebna nova ekstrakcija vzorca in/ali ponovitev koraka fragmentiranja gDNK.
Knjižnica RNK ni v skladu s specifikacijami kontrole kakovosti.	Zahteve za vnos vzorcev niso bile izpolnjene.	Zagotovite ustrezen vnos vzorca in ponovite pripravo knjižnice od koraka denaturiranje in aniliranje RNK. Glejte Zahteve glede vzorca na strani 26 in Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27.

Opažanje	Možni vzrok	Priporočen ukrep
	Napaka pri uporabi ali napaka laboratorijske opreme v poteku dela s testom.	Ponovite pripravo knjižnic od enega od naslednjih korakov, odvisno od tega, kje je prišlo do domnevne napake pri uporabi opreme. Če je prišlo do neznane ali druge napake, se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina, ki vam bo pomagala odpraviti težavo pri izvedbi postopka. - Ponovno sekvencirajte knjižnice iz PCR-plošče normalizirane knjižnice (NL). Glejte Priprava na sekvenciranje na strani 73. - Ponovite korake obogatitve za knjižnice iz PCR-plošče z vzorci s pomnoženimi knjižnicami (ALS). Glejte Nastavitev prve hibridizacije na strani 57. - S pripravo knjižnic začnite od začetka poteka dela. Glejte Denaturacija in prileganje RNK na strani 43.
	Vzorec je prekomerno fragmentiran ali ima poškodbe nukleinske kisline, ki vplivajo na sposobnost ustvarjanja zadostnih edinstvenih knjižnic.	Zagotovite ustrezen vnos vzorca. Glejte Zahteve glede vzorca na strani 26 in Ekstrakcija, kvantifikacija in shranjevanje nukleinskih kislin na strani 27. Če je vzorec prekomerno fragmentiran ali poškodovan, bo morda potrebna nova ekstrakcija vzorca.

Opažanje	Možni vzrok	Priporočen ukrep
Neuspešna pozitivna kontrola (DNK/RNK).	Zahteve za vnos vzorca za pozitivno kontrolo niso bile izpolnjene.	Zagotovite ustrezen vnos v test. Preglejte postavitev plošče in se prepričajte, da so ustrezni reagenti (sonde, indeksi) v ustreznih vdolbinicah. Zagotovite, da je vzorec pozitivne kontrole shranjen v skladu z oznako. Za vse vzorce s skupno pozitivno kontrolo ponovite pripravo knjižnice od enega od naslednjih korakov, kar je odvisno od tega, kje je prišlo do domnevne napake pri uporabi ali opremi. Če je prišlo do neznane ali druge napake, se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina, ki vam bo pomagala odpraviti težavo pri izvedbi postopka. - Ponovno sekvencirajte knjižnice iz PCR-plošče normalizirane knjižnice (NL). Glejte Priprava na sekvenciranje na strani 73. - Ponovite korake obogatitve za knjižnice iz PCR-plošče z vzorci s pomnoženimi knjižnicami (ALS). Glejte Nastavitev prve hibridizacije na strani 57. - S pripravo knjižnic začnite od začetka poteka dela. Glejte Denaturacija in prileganje RNK na strani 43 oziroma Fragmentiranje gDNK na strani 48.
	Napaka pri uporabi ali napaka laboratorijske opreme v poteku dela s testom.	
Neuspešen NTC (DNK/RNK).	Prišlo je do navzkrižne kontaminacije ali kontaminacije delovnega območja.	Preglejte razdelek Opozorila in previdnostni ukrepi za informacije o dekontaminaciji delovnih območij in preprečevanju navzkrižne kontaminacije. Preglejte postavitev plošče in indeksiranje knjižnic ter se prepričate, da niso bile hkrati sekvencirane knjižnice istega indeksa. Ponovite pripravo knjižnice od začetka poteka dela za vse knjižnice, ki imajo skupno kontrolo brez predloge.
	Nepravilno indeksiranje knjižnice.	

Opazanje	Možni vzrok	Priporočen ukrep
Programska oprema kaže, da pozitivna in/ali negativna kontrola nista bili vključeni v sekvenciranje.	Nepravilna dodelitev vrste raka pri načrtovanju izvedbe v programski opremi Local Run Manager.	Ponovno izvedite analizo s kontrolami, pravilno opredeljenimi v priročniku za potek dela z analitičnim modulom (glejte <i>Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661)</i>).

Značilnosti delovanja

TSO Comprehensive (EU) je tarčni panel za NGS, ki zaznava spremembe v 517 genih. Majhne variante DNK (varianze posameznega nukleotida [SNV-ji], multinukleotidne variante [MNV-ji], insercije in delecije) so primerne za poročanje iz vseh 517 genov. Tumorsko mutacijsko breme se poroča kot ocena na podlagi števila negonilnih somatskih variant na megabazo (za podrobnosti glejte *Vodnik po poteku dela z modulom za analizo Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Modul za analizo (dokument št. 200008661)*). MSI se poroča kot status. Pomnožitve genov so primerne za poročanje iz genov MET in ERBB2. Fuzije so primerne za poročanje iz 23 genov, navedenih v [Povzetek in razlaga testa na strani 1](#). Spojitvene variante so primerne za poročanje iz genov MET in EGFR. Da se o njih poroča, je treba variante zaznati in imeti zanje dokaze v KB testa TSO Comprehensive (EU), in biti morajo primerne na osnovi testirane vrste tkiva. Da se o njih poroča, fuzije NTRK zahtevajo, da je fuzijski partner 5' in da je domena NTRK kinaze nedotaknjena.

Za majhne variante DNK je bil izveden reprezentativni pristop k validaciji tarčnih genov v panelu s podatki, ki predstavljajo SNV-je, MNV-je, insercije in delecije. Za pomnožitve genov, fuzije in spojitvene variante je bilo testiranje opravljeno na ravni genov. TMB in MSI sta bila ocenjena, kjer je navedeno. Za CDx zahteve za fuzije NTRK so bile fuzije v vzorcih FFPE testirane v študijah, osredotočenih na učinkovitost, specifično za zahtevek (kot so meja zaznavnosti, natančnost znotraj laboratorija, ponovljivost, točnost in klinična učinkovitost).

[Preglednica 42](#) vsebuje definicije metrik, izračunanih v različnih študijah.

Preglednica 42 Opredelitve metrik

Izraz	Opredelitev
Odstotek pozitivnega ujemanja (PPA)	Odstotek s testom pozitivnih, pravilno identificiranih iz skupnih pozitivnih glede na ortogonalno metodo.
Odstotek negativnega ujemanja (NPA)	Odstotek s testom negativnih, pravilno identificiranih iz skupnih negativnih glede na ortogonalno metodo.
Odstotek skupnega ujemanja (OPA)	Odstotek pozitivnih in negativnih vrednosti, pravilno identificiran iz celotnega opazovanja glede na ortogonalno metodo.

Izraz	Opredelitev
Odstotek pozitivne določitve (PPC)	Odstotek opazovanj, ki so s testom pozitivne za tarčo, med opazovanji, za katera se pričakuje, da bodo pozitivna za tarčo.
Odstotek negativne določitve (PNC)	Odstotek opazovanj, ki so s testom negativne za tarčo, med opazovanji, za katera se pričakuje, da bodo negativna za tarčo.
n/N	Število pozitivnih ali negativnih opazovanj (n), deljeno s skupnimi opazovanji (N), za izračun PPC oziroma PNC. Vrednosti n in N so lahko na različnih ravneh (npr. varianta ali gen) ali združene v skupini (npr. SNV-ji).
Standardna deviacija (SD)	Merilo količine variacije vrednosti spremenljivke okoli njene povprečne vrednosti.
Odstotek koeficienta variacije (% KV)	Standardna deviacija, deljena s povprečjem kot odstotek.

Navzkrižna kontaminacija

Študijo prenosa vzorca so izvedli za oceno, ali so lažno pozitivni rezultati posledica kontaminacije med vdolbinicami med pripravo knjižnice vzorcev oziroma kontaminacije med izvedbami med zaporednimi izvedbami sekvenciranja. Ta analiza je bila narejena za majhne variante DNK (ki vplivajo tudi na TMB), fuzije, pomnožitve genov in MSI. Knjižnice so bile pripravljene iz karakteriziranih vzorcev v postavitvi šahovnice z izmeničnimi vzorci za oceno kontaminacije med vdolbinicami in z izmeničnimi indeksi za oceno kontaminacije med izvedbami sekvenciranja, če se sekvencirajo zaporedoma na istem instrumentu Instrument NextSeq 550Dx. Študija navzkrižne kontaminacije je pokazala nič dogodkov kontaminacije pri pregledu zaznanih variant v vsakem vzorcu, brez zaznanih lažno pozitivnih.

Za test TSO Comprehensive (EU) sta bili zasnovani dve metriki KK (CONTAMINATION_SCORE in P_VALUE) za zaznavanje kontaminacije vzorcev v vzorcih DNK. Ocenjena je bila občutljivost za zaznavanje kontaminacije. Vzorci DNK tumorja FFPE so bili pomešani z različnimi količinami normalnih vzorcev DNK FFPE, da bi ustvarili namenoma kontaminirane vzorce.

Skupno je bilo ustvarjenih 1112 opazovanj kontaminacije, ki je bila zaznana v 95 % (1054) opazovanj. Stopnja zaznavnosti se je povečala na 96 % (939/976), ko je bil odstotek kontaminacije med 10 % in 90 % (masa/masa). Od 37 opazovanj med 10 % in 90 % kontaminacije, kjer kontaminacija ni bila zaznana, jih 12 ni izpolnilo specifikacije pokritosti za določitev majhnih variant DNK. Nizka pokritost ovira zaznavanje kontaminacije, vendar majhne variante DNK ne omilijo nobenega učinka kontaminacije. Petnajst opazovanj ni ustrezalo specifikaciji pomnožitve genov (metrika KK mediane števila binov) za določitev pomnožitve genov. Za vzorce ne bo poročil o rezultatu pomnožitve genov.

Študija je pokazala, da se pričakuje, da bo pri testu TSO Comprehensive (EU) prišlo do nizke pojavnosti navzkrižne kontaminacije med vdolbinicami oziroma med izvedbami Ti rezultati skupaj z metrikami kontaminacije v programski opremi zmanjšujejo tveganje za napačne rezultate variant zaradi kontaminacije vzorcev.

Ocena kompleta za ekstrakcijo nukleinske kisline

Trije komercialno dostopni kompleti za ekstrakcijo DNK in RNK so bili ocenjeni s testom TSO Comprehensive (EU). Trije kompleti za ekstrakcijo so izolirali DNK in RNK iz istih rezin tkiva FFPE. Kompleti so se razlikovali v sredstvu za deparafinizacijo in korakih vezave nukleinske kisline ([Preglednica 43](#)). Komplet1 je bil prevladujoči komplet za ekstrakcijo, ki se je uporabljal za določanje učinkovitosti testa TSO Comprehensive (EU).

Preglednica 43 Značilnosti kompleta

Komplet	Sredstvo za deparafinizacijo	Vezava nukleinske kisline
1	Lastniško	Stolpec
2	Ksilen	Kolona
3	Mineralno olje	Magnetne kroglice

[Preglednica 44](#) in [Preglednica 45](#) povzemata učinke kompletov za ekstrakcijo na veljavnost knjižnice in določanje variant. Razlika je bila zabeležena, če so se povprečne vrednosti kompleta za ekstrakcijo bistveno razlikovala. Povprečne razlike med kompleti za ekstrakcijo so bile izračunane s kompletom 1 kot kontrolo, saj je bil komplet 1 uporabljen za ekstrakcijo večine nukleinskih kislin, uporabljenih za analitične študije testa TSO Comprehensive (EU). Poročali so o povprečni razliki glede na komplet 1, ki ponazarja, kako bi različni kompleti za ekstrakcijo vplivali na druge analitične študije testa TSO Comprehensive (EU).

Preglednica 44 Vplivi kompleta za ekstrakcijo na veljavnost knjižnice

Vrsta različice	Metrike KK knjižnice	Povprečna razlika v primerjavi s kompletom 1
Majhne variante DNK/TMB	Mediana pokritosti eksona (število) Eksoni s 50-kratno pokritostjo (%) Mediana velikosti insercije (bp)	Nižje s kompletom 2 za 56 odčitkov Višje s kompletom 3 za 0,298 % Nižje s kompletom 2 in kompletom 3 za 3 bp
MSI DNK	Uporabna mesta MSI	Višje s kompletom 3 za 8 mest
Pomnožitev genske DNK	MAD pokritosti (št.) Mediana števila binov	Nižje s kompletom 2 za 0,0043 Nižje s kompletom 2 za 0,5825, s kompletom 3 višje za 0,3086
RNK (fuzije/spojitvene variante)	Mediana velikosti insercije (bp) Log (mediana KV genov pri 500 ×) Skupaj za tarčne odčitke	Višje s kompletom 3 za 2 bp Višje s kompletom 2 za 0,029 Ni značilne razlike

Opazili so, da imata komplet za ekstrakcijo 2 in komplet 3 povečane več podpornih odčitkov, tako da imajo fuzije in spojitvene variante v bližini LoD večjo verjetnost zaznavanja zaradi izbire kompleta za ekstrakcijo.

Preglednica 45 Vpliv kompleta za ekstrakcijo na določanje variant

Vrsta varianta (enote)	Določanje variant (povprečna razlika glede na komplet 1)
Majhne variante DNK (VAF)	Ni tehnično značilno Tarčne variante: varianca med kompleti je bila majhna glede na preostalo Ne-tarčne variante: Ni značilnih razlik za prva dva bina VAF. Ni pomembnih razlik, ko je opažena statistična značilnost.
TMB (mutacija na megabazo)	Ni tehnično značilno, varianca med kompleti je bila majhna glede na preostalo
MSI (% nestabilnih mest)	Nižje s kompletom 3 za 1,9 % nestabilnih mest
Pomnožitev gena (kratna sprememba)	Višja kratna sprememba s kompletom 2 (0,06) in kompletom 3 (0,08)
Fuzije (podporni odčitki)	Komplet 2 je imel 51 % in komplet 3 je imel 23 % več podpornih odčitkov
Spojivne variante (podporni odčitki)	Komplet 2 komplet 3 sta imela 48 % več podpornih odčitkov

Moteče snovi

Ocenili so vpliv potencialnih endogenih in eksogenih snovi na učinkovitost testa TSO Comprehensive (EU). Endogene snovi (melanin in hemoglobin) so med postopkom ekstrakcije nukleinske kisline dodali v vzorce. Eksogene snovi (etanol, ksilen in proteinaza K) so bile prisotne med postopkom ekstrakcije nukleinske kisline, prav tako pa so jih pred pripravo knjižnice dodali v prečiščeno nukleinsko kislino. Če so opazili motnje zaradi proteinaze K, so ocenili tudi povečane koncentracije proteinaze K med postopkom ekstrakcije. Med pripravo knjižnice so bili dodani presežni indeksni začetni oligonukleotidi (15 % in 30 %). Razen indeksnih začetnih oligonukleotidov so bile v vzorce FFPE dodane snovi iz tkiva možganov, dojke, debelega črevesa, pljuč, medularne ščitnice, NSCLC, jajčnikov, prostate, žleze slinavke, kože, mehkega tkiva in tkiva ščitnice – osem vzorcev je bilo ekstrahiranih za analizo DNK, 13 pa za analizo RNK. Za indeksne začetne oligonukleotide je bilo za analizo DNK uporabljenih šest vzorcev FFPE iz treh različnih vrst tkiva (ščitnica, sečni mehur, debelo črevo), za analizo RNK pa pet vzorcev FFPE iz štirih različnih vrst tkiva (pljuča, ščitnica, debelo črevo, dojka). Za vsakega od 16 edinstvenih vzorcev so izvedli endogeno kontrolo brez dodajanja snovi in eksogeno kontrolo z dodanim pufrom ali vodo. Učinek nekroze so ocenili na drugem naboru osmih vzorcev FFPE iz tkiva možganov, debelega črevesa in pljuč. Za vsak vzorec nekroze je bil uporabljen makro-razrezan kontrolni vzorec brez nekroze. Za vse moteče snovi so bili s testom TSO Comprehensive (EU) testirani štirje replikati na vzorec na snov in primerjani z njihovimi ustreznimi kontrolnimi pogoji za zaznavanje majhnih variant DNK, pomnožitev genov, fuzij RNK in spojitvenih variant RNK ter za status MSI in oceno TMB. Vključene so bile variante CDx in profiliranja tumorjev.

Zaznavanje variant DNK

Melanin (0,2 µg/ml), hemoglobin (2 mg/ml), etanol (5 %), proteinaza K (0,04 mg/ml v nukleinski kislini) in ksilen (0,0001 %) ne vplivajo na oceno TMB, status MSI, majhne variante DNK in pomnoževanje genov.

Zaznavanje variant RNK

Podatki ne podpirajo motečega vpliva melanina (0,2 µg/ml), etanola (5 %) in ksilena (0,0001 %) na fuzije RNK ali spojitvene variante. Hemoglobin (2 mg/ml) je motil (zmanjšal število podpornih odčitkov) tri različne spojitvene variante v genu MET. Spojitvena varianta v genu AR (trije različni vzorci) in ena v genu EGFR (en vzorec) nista bili prizadeti. Če laboratorij analizira RNK s testom, se je treba pri pridobivanju rezin iz tkivnega bloka izogibati hemoglobinu ali zmanjšati tkivo s hemoglobinom.

Proteinaza K (0,04 mg/ml v nukleinski kislini) je motila fuzijo RNK in spojitvene variante. Proteinaza K je bila testirana pri koncentracijah 2,6 mg/ml in 5,2 mg/ml med postopkom ekstrakcije, kar je 2-kratnik in 4-kratnik standardne koncentracije v komercialno dostopnem kompletu. Fuzije so bile zavirane pri 4-kratniku proteinaze K, ne pa tudi pri njenem 2-kratniku. Spojitvene variante so bile zavirane pri 2-kratniku proteinaze K. Proteinaze K ali enakovrednega encima med ekstrakcijo ne sme biti več, kot je njena standardna koncentracija v kompletu za ekstrakcijo.

Število podpornih odčitkov za spojitvene variante se zmanjša s 30-odstotnim presežkom indeksnih začetnih oligonukleotidov, ne pa tudi s 15-odstotnim presežkom.

Nekroza

Prisotnost nekrotičnega tkiva do 70 % ni motila rezultata TMB, statusa MSI ali majhnih variant DNK. Zaznavanje variant RNK (podporni odčitki) in zaznavanje pomnožitve gena (kratna sprememba) sta bila zmanjšana v vzorcih z ≥ 25 % oziroma ≥ 23 % (po površini) nekrotične vsebine v območju tkiva. Če odseki vzorca vsebujejo ≥ 23 -odstotno nekrozo v celotni površini tkiva, je treba nekrotično tkivo makrodiseksirati.

Stabilnost

Stabilnost v realnem času

Za določitev roka uporabnosti kompleta testa TSO Comprehensive (EU), shranjenega v skladu s pogoji na oznaki, je bila uporabljena stabilnost v realnem času. Načrt študije je temeljil na testiranju treh serij reagentov in je uporabil klasično zasnovo študije stabilnosti, opisano v CLSI EP25-A. Kompleti so bili shranjeni v končni konfiguraciji kompleta za čas trajanja študije pri pogojih shranjevanja, opredeljenih na oznaki izdelka. Zamrznjene komponente kompleta so bile shranjene pri temperaturi od -15 °C do -25 °C. Hlajene komponente kompleta so bile shranjene pri temperaturi od 2 °C do 8 °C.

Kompleti so bili v določenih časovnih točkah testirani glede videza in funkcionalnih meril za sprostitev kompleta. Poleg tega so bili za kontrolni material KK analizirani trendi določanja variant in metrika KK pri vzorcih. Rok

uporabnosti je bil določen za vsak reagent. Datumi izteka roka uporabnosti se določijo na podlagi datuma izdelave in roka uporabnosti. Rok uporabe kompleta se določi na podlagi reagenta, ki mu prvemu poteče rok uporabe.

Stabilnost kompleta med uporabo

Stabilnost kompleta testa TSO Comprehensive (EU) med uporabo je bila ocenjena v standardnih pogojih uporabe tekom roka uporabnosti, da se zagotovi podpora večkratni uporabi kompleta. Komplet reagenta je bil podvržen večkratnemu ciklu zamrzovanja/odmrzovanja in preizkušen za podporo do 4-kratni uporabi kompleta. Poleg tega je bilo 8 RNK in 8 DNK knjižnic pripravljenih skupaj 3-krat, da bi testirali največje število podprtih knjižnic (24 DNK in 24 RNK knjižnic na komplet). V vseh testiranih ciklih zamrzovanja in odmrzovanja ter časovnih točkah so bila izpolnjena vsa funkcionalna merila za sprostitev kompleta. Za oceno vpliva testiranja med uporabo na določanje variant je bilo izvedeno testiranje vzorcev FFPE z reagenti, starimi ≥ 25 mesecev. Kvalitativna analiza tarčnih variant kaže, da dogodki med uporabo niso vplivali na določanje variant.

Stabilnost nukleinske kisline

Stabilnost nukleinskih kislin (DNK in RNK) ter njihova povezana kvantifikacija za uporabo v testu TSO Comprehensive (EU) sta bili ocenjeni z uporabo vzorcev FFPE iz več vrst tkiv. Bloki FFPE so bili razrezani in vse nukleinske kisline so bile ekstrahirane sočasno. Ekstrahirana nukleinska kislina je bila temeljito premešana, kvantificirana, preverjena glede kakovosti nukleinske kisline ter alikvotirana v dva sklopa epruvet za enkratno uporabo, ki sta bila zamrznjena za dve časovni točki: Kontrola T0 (izhodišče) in test T1 (≥ 28 dni). Vsa ekstrahirana RNK je bila shranjena pri temperaturi od -85°C do 65°C , vsa ekstrahirana DNK pa je bila shranjena pri temperaturi od -25°C do -15°C za navedeno časovno obdobje, nato pa jo je več operaterjev obdelalo v replikatih s testom TSO Comprehensive (EU). Stanje testa T1 so primerjali s kontrolo za status MSI, oceno TMB, pomnožitve genov, majhne variante DNK, fuzije RNK in spojivne variante RNK. Podatki kažejo, da so nukleinske kisline in njihova povezana kvantitativna vrednost za uporabo s testom TSO Comprehensive (EU) stabilne do 28 dni, če so shranjene pri priporočenih temperaturah (RNK pri temperaturi od -85°C do -65°C in DNK pri temperaturi od -25°C do -15°C).

Stabilnost knjižnice

Stabilnost knjižnic z uporabo vsake od šestih točk varne zaustavitve za test (glejte [Preglednica 5](#)) so ocenili z uporabo vzorcev FFPE iz več vrst tkiv. Knjižnice kontrol (T0, brez točk zaustavitve) so bile sekvencirane takoj ob koncu poteka dela. Alikvoti iz istih knjižnic so bili shranjeni na točkah zaustavitve pri temperaturi od -25°C do -15°C za čas (T1), kar podpira dneve, navedene v [Preglednica 5](#). T1 so primerjali s T0 za majhne variante DNK, TMB, pomnožitve genov, MSI, fuzije RNK in spojivne variante RNK s CDx in variante profiliranja tumorja. Podatki kažejo, da so knjižnice, pridobljene s testom TSO Comprehensive (EU), stabilne v skladu z navodili za uporabo.

Stabilnost tkiva FFPE, pritrjenega na stekelce

Stabilnost tkiv FFPE, pritrjenih na stekelca, za uporabo s testom TSO Comprehensive (EU) je bila ocenjena s sekcijo blokov FFPE (debelina rezin 5 µm) iz različnih edinstvenih vzorcev, pritrjenih na stekelca, nato pa shranjenih pri sobni temperaturi (22 °C) v dveh časovnih točkah. RNK je bila ekstrahirana in shranjena pri temperaturi od -65 °C do -85 °C, DNK pa je bila ekstrahirana in shranjena pri temperaturi od -15 °C do -25 °C manj kot en teden pred testiranjem. Material nukleinske kisline je bil kvantificiran in nato obdelan s testom TSO Comprehensive (EU) v roku 24 ur za vsako časovno točko. V vsaki časovni točki je bilo za vsak vzorec s testom TSO Comprehensive (EU) testiranih več replikatov in več operaterjev, rezultati pa so bili primerjani s časovno točko T0 za MSI, TMB, pomnožitve genov, majhne variante DNK, fuzije RNK in spojivne variante RNK, vključno s CDx in variantami tumorskega profiliranja. Ocenjeno je bilo določanje variant in izpolnjuje vsa merila sprejemljivosti, kar kaže, da so tkiva FFPE, pritrjena na stekelca, pri uporabi s testom TSO Comprehensive (EU) stabilna pri sobni temperaturi do 4 tedne (28 dni). Opozoriti je treba, da je bil po 4 tednih (28 dneh) zaznan 10-odstotni upad stopnje veljavnosti KK knjižnic za MSI, kar je posledica kombinacije vpliva operaterja in časa shranjevanja. Fuzije RNK in spojivne variante so imele približno 29-odstotno zmanjšanje podpornih odčitkov po shranjevanju na stekelcih 4 tedne (28 dni).

Varovalno območje titracije vnosa nukleinske kisline

Vnos nukleinskih kislin za test TSO Comprehensive (EU) je bil ocenjen s testiranjem DNK iz 33 vzorcev FFPE, ki so zajemali 17 vrst tkiv, z ravno vnosa od 10 ng do 500 ng, in testiranjem RNK iz 5 vzorcev FFPE iz 5 vrst tkiv z ravno vnosa od 10 ng do 85 ng. Ocenjene so bile metrike KK knjižnice in so bile odvisne od vzorca. Rezultati DNK so pokazali, da se nekatere, vendar ne vse, metrike KK vzorca DNK odzivajo na povečan vnos nad nazivnim vnosom 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE se ni odzval na vnos nad 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE je pokazal pozitivno korelacijo z naraščajočim vnosom.
- PCT_EXON_50X se je povečal s povečanjem vnosa do 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES se je povečal z naraščajočim vnosom. Nekateri vzorci z manj kot 40 USABLE_MSI_SITES pri 40 ng so ustrezali specifikaciji pri višjih vnosih, kar bi omogočilo izračun ocene MSI.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET se je povečal s povečanjem vnosa.
- Povečanje vnosa za povečanje COVERAGE_MAD proti zgornji meji specifikacije.

Metrike KK vzorca RNK so se povečale (MEDIAN_INSERT_SIZE in TOTAL_ON_TARGET_READS) ali zmanjšale (MEDIAN_CV_GENE_500X) z 10 ng na 40 ng, vendar se na splošno niso spremenile pri količini vnosa med 40 ng in 85 ng.

Meja slepega vzorca

Odstotek lažno pozitivnih rezultatov (od skupnih pričakovanih negativnih rezultatov) so ocenili s testiranjem replikatov normalnega FFPE ali benignega sosednjega tkiva, ki ne sme vsebovati somatskih variant za majhne variante DNK, pomnožitve genov, MSI, fuzij RNK in spojivnih variant RNK. Lažno pozitivnih rezultatov niso

analizirali za TMB, saj ni klinične meje. Šest vzorcev DNK in 6 vzorcev RNK FFPE je bilo testiranih v dvojniku z 2 operaterjema v 3 dneh za vsako od 2 serij reagentov. Podmnožica vzorcev je bila ponovno združena in ponovno sekvencirana v obliki samo 3-kratne DNK in 3-kratne RNK, da bi ocenili lažno pozitivne rezultate z več multipleksnimi konfiguracijami, ki jih podpira ta pripomoček. Poleg tega je bilo 30 dodatnih vzorcev RNK testiranih v dvojniku, obdelanih z 1 serijo reagentov, razdeljenih med 2 operaterja. Skupno je bilo 168 možnih opazanj za DNK in 228 opazanj za RNK, zmanjšanih za neveljavne knjižnice za vsako vrsto variante. Odstotek lažno pozitivnih rezultatov je bil izračunan na ravni genov za pomnožitve in na ravni položaja (približno 1,9 milijona položajev) za majhne variante DNK. Odstotek lažno pozitivnih rezultatov za vrste variant DNK je prikazan v [Preglednica 46](#). TSO Comprehensive (EU) nima zahtevkov CDx (raven 1) za majhne variante DNK, zato ni mogoče poročati o lažno pozitivnih rezultatih za majhne variante DNK za raven 1. 271 lažno pozitivnih rezultatov je bilo ponderiranih glede na zbirko znanja TSO Comprehensive (EU). Noben lažno pozitiven rezultat ni bil klinično pomemben (raven 2). Na ravni 3 so bili 4 lažno pozitivni rezultati, ki so izhajali iz dveh variant pri 4 (2,4 %) opazanjih od skupno 168 opazanj. Odstotek lažno pozitivnih rezultatov za fuzije RNK in spojitvene variante je bil 0 %, kot je prikazano v [Preglednica 47](#).

Preglednica 46 Lažno pozitivni rezultati glede na vrsto variant DNK

Vrsta različice	Lažno pozitivni rezultati
Pomnožitve genov	0 % (0/9912)
Majhne variante DNK	0,0001 % (271/295.801.567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Ni na voljo*

* Lažno pozitivni rezultati niso relevantni, ker se TMB poroča kot ocena in nima kvalitativnega izida.

Preglednica 47 Lažno pozitivni rezultati glede na vrsto variant RNK

Vrsta različice	Lažno pozitivni rezultati
Fuzija	0 % (0/227)
Spojitvena varianta	0 % (0/227)

Meja zaznavnosti

Izvedeni sta bili dve študiji za oceno meje zaznavnosti za test TSO Comprehensive (EU). Študija 1 je ocenila majhne variante DNK RET, fuzije RET in fuzije NTRK1-3. Študija 2 je ocenila druge variante profiliranja tumorja.

Študija 1

Določene so bile meje zaznavnosti (LoD) majhnih variant DNK NTRK1, NTRK3 in RET ter fuzij NTRK1-3 in RET. LoD je najmanjša vrednost analita (npr. frekvenca alelov variant ali podporni odčitki), ki jo je mogoče dosledno zaznati (meja zaznavnosti 95 % ali napaka tipa II v višini 5 %). V študiji so uporabili tkiva FFPE z majhnimi

variantami DNK RET (medularni rak ščitnice), fuzijami RET (papilarni rak ščitnice, atipični tumor Spitz) in fuzijami NTRK1-3 (gliom majhnega stadija, multiformni glioblastom, miofibroblastični sarkom, sarkom, sekretorni rak dojke, rak debelega črevesa) ter celično linijo, obdelano s FFPE, z majhnimi variantami DNK NTRK1 in NTRK3. Vsak vzorec je bil redčen na vsaj 5 testnih ravni (od približno 0,01 do 0,10 VAF za majhne variante DNK in 2–25 podpornih odčitkov za fuzije). Za vsako raven testa na serijo na varianto je bilo ustvarjenih 18 opažanj 3 operaterjev na 3 instrumentih za sekvenciranje, ki so začeli s pripravo knjižnice v 3 nezaporednih dneh z 2 ponovitvama vsake ravni vzorca. Preizkusili so dve seriji reagentov.

Pri variantah DNK sta bili 2 seriji neodvisno analizirani z regresijo probit ali pristopom deleža zaznanih napak (najnižja raven testa z deležem zaznanih napak (točkovna ocena) $\geq 95\%$) za določitev LoD za vsako varianto na serijo. Večja LoD v obeh serijah reagentov je bila sprejeta kot meja zaznavnosti za varianto ([Preglednica 48](#)).

Pri fuzijah RNK so bile uporabljene celične linije FFPE za oceno vrednosti LoD za vsak fuzijski gen. LoD so nato preverili s tkivi FFPE z uporabo pripravkov iz knjižnice v dvojniku pri 3 operaterjih, 3 instrumentih in 3 serijah reagentov, da bi ustvarili 54 opažanj na varianto v bližini LoD, določeni s celičnimi linijami FFPE. Navedena meja zaznavnosti za posamezno fuzijo ([Preglednica 49](#)) je najmanjša povprečna vrednost podpornih odčitkov, ki je dosegla delež zaznanih napak (točkovna ocena) $\geq 95\%$.

Preglednica 48 Meja zaznavnosti za majhne variante DNK NTRK1, NTRK3 in RET

Označevalec	Chr ¹	Položaj	Referenca	Alternativna možnost	Meja zaznavnosti (frekvenca alelov variant)
NTRK1 G595R (SNV) ²	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV) ²	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV) ²	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV) ²	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (delecija) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = kromosom

² Te variante DNK so analizirali z regresijo probit. Druge variante DNK so analizirali s pristopom deleža zaznanih napak.

Preglednica 49 Meja zaznavnosti za fuzije NTRK in RET

Gen	Fuzija	Meja zaznavnosti (podporni odčitki)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Študija 2

Ocenjene so bile meje zaznavnosti (LoD) tumorskega profiliranja variant, o katerih poroča test TSO Comprehensive (EU). LoD je najmanjša vrednost analita (npr. frekvenca alelov variant, večkratna sprememba ali podporni odčitki), ki jo je mogoče dosledno zaznati (delež zadetkov 95 % ali napaka tipa II v višini 5 %). Vzorci FFPE iz 17 vrst tkiv, ki vsebujejo variante, so bili redčeni na več testnih ravni. Dva operaterja sta ustvarila šest opazanj na raven, vsak z uporabo drugačne serije reagentov in instrumentom.

Variante DNK

LoD 10 razredov majhnih variant DNK (skupno 25 variant) in 2 pomnožitev genov DNK (ERBB2 in MET) so bili določeni in povzeti kot razponi ([Preglednica 50](#)). Vključene so tudi variante RET iz LoD študije 1. Dve od 3 insercij, večjih od 5 bp, sta imeli LoD 0,034 in 0,036 VAF, pri čemer je imela tretja LoD 0,215 VAF. Slednja je bila insercija v območje z nizko kompleksnostjo, kjer insercija doda dodatne ponovitve, vpliva na poravnavo in zahteva več odčitkov za dosledno zaznavanje. Zato lahko nekateri genomske konteksti z nizko kompleksnostjo vplivajo na zaznavanje insercij > 5 bp.

Preglednica 50 Meja zaznavnosti za majhne variante DNK in pomnožitve genov

Vrsta (merska enota za LoD)	Razred variant/ genomske kontekst	Število variant	Razpon (VAF)
Majhne variante DNK (frekvenca variantnega alela)	SNV-ji	5	0,016–0,064
	MNV-ji	3	0,022–0,048
	Insercija (1–2 bp) v bližini homopolimernih ponovitev	2	0,086–0,104
	Insercija (1–2 bp) v bližini dinukleotidnih ponovitev	2	0,038–0,051
	insercija (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Insercija (> 5 bp in do 25 bp)	3	0,034–0,215
	Delecija (1–2 bp) v bližini homopolimernih ponovitev	2	0,094–0,100
	Delecija (1–2 bp) v bližini dinukleotidnih ponovitev	2	0,033–0,070
	Delecija (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Delecija (> 5 in do 25 bp)	2	0,047–0,055
Pomnožitev gena (kratna sprememba)	Po genih (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Analiza netarčnih variant je bila izvedena iz vzorcev študije 1, ki so imeli vsaj pet ravni testiranja. Vsaka netarčna varianta je bila analizirana posamič in LoD je bil ocenjen samo za variante z vsaj eno ravno > 0 % in deležem zadetka ≤ 95 % ter vsaj eno stopnjo deleža zadetka ≥ 95 %. [Preglednica 51](#) prikazuje percentile skupaj z najmanjšimi in največjimi LoD, opaženimi po razredu za netarčne variante. Netarčne variante zagotavljajo več variant po razredih kot tiste, ki so bile testirane v študiji 2, in so skladne z razponi LoD iz [Preglednica 50](#).

Preglednica 51 Povzetek statistike za mejo zaznavnosti po razredih netarčnih variant (iz študije 1)

Razred	N	Najm.	25 %	50 %	75 %	90 %	Najv.
SNV	862	0,020	0,047	0,059	0,079	0,097	0,592
MNV	5	0,038	0,040	0,050	0,086	0,095	0,095
Insercija	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Delecija	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Fuzije

LoD so bile določene za 19 fuzij, kar predstavlja 20 genov v naboru TSO Comprehensive (EU), ki so imeli od 9 do 31,3 podpornih odčitkov ([Preglednica 52](#)). V drugi študiji so testirali še 3 gene (NTRK1-3). Gen RET je bil testiran tako tukaj kot tudi v drugi študiji. Šestnajst fuzij z določenimi LoD je imelo podatke, skladne s skupno LoD 16 podpornih odčitkov z uporabo dvostranske, 95-odstotne zgornje meje zaupanja (UCL). Dve fuziji sta imeli LoD 24,7 in 31,3 podpornega odčitka, kar ni bilo skladno s skupno LoD.

Fuzija FGFR2-SRPK2 z vrednostjo LoD 24,7 podpornih odčitkov je imela ponavljajoče prekrivajoče se regije na mestu preloma, kot je označeno s programsko opremo testa TSO Comprehensive (EU). Ponavljajoče se regije znotraj prelomne točke imajo običajno nižjo raven dokazov, saj se lahko odčitki preslikajo drugje v genomu ali pa ostanejo nepravilni. Poleg tega ponavljajoče se regije naredijo postopek sestavljanja (ki se uporablja za prepoznavanje fuzijskih zaporedij) bolj zahteven in zahtevajo dodatne dokaze za izgradnjo pravilnega zaporedja. SEPT14-EGFR je še en primer fuzije s homolognim zaporedjem na mestu preloma.

Fuzija BCL2-IGHJ5 z vrednostjo LoD 31,3 podpornih odčitkov je imela zelo kratek gen (IGHJ5) z mestom preloma blizu začetka eksona, kar zahteva kratke poravnave z vrzelmi. Zato je bilo za dosledno zaznavanje potrebnih več odčitkov.

Preglednica 52 Meja zaznavnosti za fuzije

Fuzija	Prelomno mesto gena A	Prelomno mesto gena B	LoD	Skupni LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	Da
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	Da
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	Da
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	Da
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	Da
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	Da
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	Da
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	Da
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	Da
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	Da

Fuzija	Prelomno mesto gena A	Prelomno mesto gena B	LoD	Skupni LoD
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	Ne
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	Da
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	Da
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	Da
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	Da
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	Da
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	Da
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	Ne
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	Da

Spojitvene variante

Dve spojitveni varianti RNK, MET in EGFR sta imeli LoD 18,7 oziroma 16,7 podpornih odčitkov.

Vsebina tumorja

Rezultati študije so podlaga za priporočila glede vsebine tumorja v kliničnih vzorcih. Na splošno velja, da večja kot je vsebnost tumorja, večji je signal (VAF, večkratna sprememba ali podporni odčitki) za variante v tumorju. Priporočila o minimalni vsebnosti tumorja temeljijo na naslednjih opažanjih. Vrednosti LoD za majhne variante DNK niso večje od 0,104 VAF (z izjemo insercije TP53). Za zaznavanje vodilnih mutacij v tumorju (frekvenca alela variante 0,50) je priporočljiva 20-odstotna vsebnost tumorja, tako da bi te mutacije imele VAF 0,10 in bi bile pri LoD ali nad njo. Pri 20-odstotni vsebnosti tumorja bi bili geni, pomnoženi na 5,5-kratno spremembo (11 kopij), dosledno odkriti na podlagi meje zaznavnosti 1,8-kratne spremembe. Pri 20-odstotni vsebnosti tumorja bi bile fuzije s 74 podpornimi odčitki dosledno zaznane na podlagi meje zaznavnosti 14,7 podpornih odčitkov.

Ponovljivost

Za oceno ponovljivosti testa TSO Comprehensive (EU) sta bili izvedeni dve študiji. Študija 1 je ocenila majhne variante DNK RET poleg variant NTRK in fuzijskih variant RET. Študija 2 je ocenila dodatne variante profiliranja tumorja.

Študija 1

Ta študija je bila izvedena za oceno ponovljivosti testa TSO Comprehensive (EU) na 3 mestih testiranja (1 notranje, 2 zunanji) z 2 operaterjema na študijsko mesto, 2 replikatoma v isti izvedbi in v 3 nezaporednih dneh testiranja. Testiranje je bilo izvedeno s panelom za ponovljivost, vključno z vzorci DNK, ki vsebujejo specifične znane majhne variante DNK RET, in vzorci RNK, ki vsebujejo specifične znane variante NTRK1-3 in variante fuzije RET iz vzorcev tkiva, fiksiranega s formalinom, vklopljenega v parafin (FFPE), in celičnih linij. Panel je vseboval člane panela DNK in RNK z nizkimi ravnmi variant in visokimi ravnmi variant z enakim številom članov

panela nizke in visoke ravni za vsak razred variant. Člani panela z visoko ravni so bili tarča približno 2- do 3-kratnika LoD, člani panela na nizki ravni pa približno LoD. Na vsakem mestu je vsak operater trikrat testiral člane panela v duplikatu in ustvaril 6 opazovanj na tarčo na člana panela. Iz vseh treh mest je bilo ustvarjenih 36 opazovanj na člana panela (3 mesta/instrumenti × 2 operaterja × 2 replikativ isti izvedbi × 3 začetni dnevi).

PPC-ji in PNC-ji za tarčne majhne variante DNK in tarčne variante fuzije RNK z visoko ravni so bili določeni kot primarni opazovani dogodki. PPC-ji in PNC-ji za tarčne majhne variante DNK in tarčne variante fuzije RNK z nizko ravni so bili izračunani kot sekundarni opazovani dogodki. Dvostranski 95-odstotni intervali zaupanja (IZ), povezani z vsemi opazovanimi dogodki, so bili izračunani z metodo Wilsonove ocene. Primarne analize so bile izvedene za oceno PPC in PNC (s povezanimi 95-odstotnimi IZ) pri tarčnih članih panela z visoko ravni s kombiniranjem opazovanj testa TSO Comprehensive (EU) za dano tarčo v skupini članov panela, ki predstavljajo ustrezeni razred variant (na primer majhne variante DNK in fuzije RNK) po mestih/instrumentih, operaterjih in izvedbah. Za vsako tarčno varianto so bila opažanja testa TSO Comprehensive (EU) pri drugih članih panela z visoko ravni, ki so bila tarčna za isto vrsto variante, vendar niso vsebovala iste variante, kot jo določa pravilo večine, združena v izračunan PNC. Na podoben način sta bila določena celokupni PPC in PNC za tarčne člane panelov nizke ravni.

Majhne variante DNK RET

Pri članih panela z majhnimi variantami DNK na visoki ravni je bil skupni PPC 100,0 % (207/207; 95 % IZ: 98,2 % do 100,0 %) ([Preglednica 53](#)). Skupna vrednost PNC za člane panela z majhnimi variantami DNK na visoki ravni je bila 100,0 % (1035/1035; 95 % IZ: 99,6 % do 100,0 %) ([Preglednica 54](#)). Za člane panela z nizko ravni tarčne majhne variante DNK je bil skupni PPC za člane panela z nizko ravni tarčne majhne variante DNK 99,1 % (210/212; 95 % IZ: 96,6 % do 99,7 %), skupni PNC pa 100,0 % (1026/1026; 95 % IZ: 99,6 % do 100,0 %).

Preglednica 53 PPC za test TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje majhnih variant DNK RET za tarčne člane panela z visoko in nizko ravnjo

Raven variante	Vrsta različice	Tarčna varianta (nukleotid)	Tarčna varianta (aminokislina)	N	Povprečni VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95 % IZ ²
~2–3 × LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Delecija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Vse majhne variante DNK visoko	Vse majhne variante DNK visoko	Vse majhne variante DNK visoko	207	Ni na voljo ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1 × LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Delecija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Vse majhne variante DNK nizko	Vse majhne variante DNK nizko	Vse majhne variante DNK nizko	212	Ni na voljo ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Okrajšave: N/A, ni ustrezno; VAF, frekvenca alela variante.² Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja, izračunan z metodo Wilsonove ocene.

Preglednica 54 PNC za test TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje majhnih variant DNK RET za tarčne člane panela z visoko in nizko ravnjo

Raven variante	Vrsta različice	Tarčna varianta (nukleotid)	Tarčna varianta (aminokislina)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % IZ ²
~2–3 × LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Delecija	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insercija	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Vse majhne variante DNK visoko	Vse majhne variante DNK visoko	Vse majhne variante DNK visoko	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1 × LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Delecija	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insercija	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Vse majhne variante DNK nizko	Vse majhne variante DNK nizko	Vse majhne variante DNK nizko	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Vsa opažanja so združena iz kombinacij članov panela in variant, pri katerih je večina odčitkov negativnih (tarčne variante, ki vsebujejo fuzije z manj kot 50 % pozitivnih določitev).

² Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja, izračunan z metodo Wilsonove ocene.

Preglednica 55 prikazuje analizo komponent variance frekvence alelov variant (VAF) pri približno 36 opažanjih za vsakega člana panela. Standardna varianca (SD) in odstotni koeficient variacije (% KV; skupno in za vsak vir) sta bila izračunana in predstavljena za vsako tarčno majhno varianto DNK RET.

Preglednica 55 Analiza komponent variance VAF za test TSO Comprehensive (EU) pri članih panela s tarčnimi majhnimi variantami DNK

Raven variante	Vrsta različice	Tarčna varianta (nukleotid)	Tarčna varianta (aminokislina)	N	Povprečni VAF	SD mesta (% KV)	SD operaterja (% KV)	SD dneva (% KV)	SD replikatov (% KV)	Skupni SD (% KV)
~2– 3 × LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Delecija	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)
	Insercija	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)
~1 × LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (22,2)	0,009 (22,2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0)	0,003 (9,8)	0,002 (6,2)	0,007 (21,7)	0,008 (24,6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,008 (17,5)	0,008 (18,5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0)	0,008 (10,7)	0,000 (0,0)	0,011 (14,9)	0,013 (18,4)
	Delecija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	0,002 (2,5)	0,006 (9,9)	0,004 (6,4)	0,010 (16,2)	0,013 (20,2)
	Insercija	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)

Fuzije NTRK 1-3 in RET

Za člane panela z visoko ravno fuzij RNK je bil skupni PPC 99,3 % (285/287; 95 % IZ: 97,5 % do 99,8 %) ([Preglednica 56](#)). PPC je bil 100 % za vsakega člana panela z visoko ravno, razen za člana panela BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % IZ: 81,9 % do 98,5 %]). Skupni PNC člane panela z visoko ravno fuzij RNK je bil 100,0 % (1724/1724; 95 % IZ: 99,8 % do 100,0 %) ([Preglednica 57](#)). Za člane panela z nizko ravno tarčne fuzije RNK je bil skupni PPC 95,4 % (272/285; 95 % IZ: 92,3 %, 97,3 %), skupni PNC pa 100,0 % (1851/1851; 95 % IZ: 99,8 % do 100,0 %).

Preglednica 56 PPC za test TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje fuzij NTRK in RET za tarčne člane panela z visoko in z nizko ravno

Raven variante	Tarčna fuzija	N	Povprečje podpornih odčitkov	PPC (%) (n/N)	95 % IZ*
~2–3 × LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Vse fuzije, visoka raven	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1 × LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 (29/36)	(65,0, 90,2)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 (33/34)	(85,1, 99,5)
	Vse nizke fuzije	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja (IZ), izračunan z metodo Wilsonove ocene.

Preglednica 57 PNC za test TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje fuzij NTRK in RET za ne-tarčne člane panela z visoko in z nizko ravno

Raven variante	Tarčne fuzije	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % IZ ²
~2–3 × LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Vse fuzije, visoka raven	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
~1 × LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Vse fuzije, nizka raven	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Vsa opažanja so združena iz kombinacij članov panela in variant, pri katerih je večina odčitkov negativnih (tarčne variante, ki vsebujejo fuzije z manj kot 50 % pozitivnih določitev).

² Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja (IZ), izračunan z metodo Wilsonove ocene.

Preglednica 58 prikazuje analizo komponent variance, ki podpira odčitke približno 36 opaženj znotraj vsake tarčne fuzije. SD in % KV (skupni in za vsak vir) sta izračunana in predstavljena za vsako tarčno fuzijo.

Preglednica 58 TSO Comprehensive (EU) Analiza komponent variance testa podpornih odčitkov za člane panela s tarčno fuzijo RNK

Raven variante	Fuzija	N	Povprečje podpornih odčitkov	SD mesta (% KV)	SD operaterja (% KV)	SD dneva (% KV)	SD replikatov (% KV)	Skupni SD (% KV)
~2–3 × LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9)	3,37 (9)	6,93 (18)	9,04 (24)	12,39 (33)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41)	7,87 (23)	5,40 (16)	8,95 (27)	18,98 (57)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33)	3,50 (14)	4,20 (17)	4,86 (20)	10,86 (44)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31)	4,24 (12)	6,82 (19)	6,87 (19)	15,57 (43)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20)	10,20 (18)	9,25 (16)	8,69 (15)	19,93 (35)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5)	2,65 (8)	2,16 (7)	10,47 (32)	11,11 (34)
	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13)	4,09 (11)	6,17 (17)	5,20 (14)	10,17 (28)
	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22)	2,56 (8)	6,53 (20)	5,51 (16)	11,49 (34)
~1 × LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13)	0,00 (0)	2,74 (20)	4,37 (32)	5,47 (40)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17)	2,98 (18)	4,61 (27)	5,82 (34)	8,52 (50)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0)	3,41 (22)	3,83 (25)	4,39 (29)	6,75 (45)
	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13)	0,61 (5)	2,33 (17)	2,57 (19)	3,95 (29)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24)	3,46 (14)	0,00 (0)	6,39 (26)	9,44 (38)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,64 (37)	6,71 (37)
	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13)	1,03 (7)	0,00 (0)	5,11 (32)	5,61 (36)
	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12)	0,00 (0)	1,58 (10)	5,83 (35)	6,39 (39)

Študija 2

Druga študija je bila izvedena za oceno ponovljivosti testa TSO Comprehensive (EU) na 3 mestih preskušanja (2 zunanji in 1 notranje), z 2 operaterjema/instrumentoma na mesto, 3 edinstvenimi serijami reagentov, 4 testnimi dnevi (nezaporednimi) in 2 izvedbama sekvenciranja na knjižnico vzorcev.

Testiranje so izvajali z ekstrahiranimi vzorci DNK in RNK iz 41 vzorcev tkiva FFPE in 1 celične linije FFPE (z 1 vzorcem tkiva FFPE in celično linijo FFPE za ustvarjanje po 2 članov panela). Vzorci tkiva so bili iz naslednjih vrst: sečnega mehurja, kosti, možganov, dojke, debelega črevesa, jejunuma, ledvice, jeter, pljuč, jajčnikov, prostate, kože, mehkega tkiva, želodca, ščitnice in maternice. Skupno je bilo testiranih 44 članov panela, vključno s člani panela DNK z majhnimi variantami DNK (SNV, MNV, insercijami in delecijami), s pomnožitvami genov, z različnimi ocenami TMB, velikimi ocenami MSI in člani panela RNK s fuzijami in spojitvenimi variantami. Večina članov panela je imela znane tarčne variante na ravneh približno 2- do 3-kratne meje zaznavnosti, specifične za varianto (~2–3 × LoD).

LoD je koncentracija analita, pri kateri so opaženi rezultati testa pozitivni (varianta je zaznana glede na mejo testa TSO Comprehensive (EU)) pri ≥ 95 % primerov. Povprečne opažene ravni variant so bile razvrščene kot približno < 2 × LoD (opažene ravni variant pri < 1,5 × LoD), ~2–3 × LoD (opažene ravni variant pri 1,5 × LoD do 3,4 × LoD) in približno > 3 × LoD (opažene ravni variant pri > 3,4 × LoD).

PPC za majhne variante DNK, pomnožitve genov, velik rezultat MSI in variante RNK so izračunali s kombiniranjem opažanj pri izvedbah in mestih sekvenciranja. Podobno so bili izračunani PNC za majhne variante DNK, pomnožitve genov in variante RNK. Pri vsaki znani tarčno varianto so opažanja s testom TSO Comprehensive (EU) pri članih panela iste vrste variante, ki vsebuje druge variante, ki niso pridobljene iz istega izvornega vzorca in ne izpolnjujejo pravila večine za to varianto (< 50 % določitev je bilo pozitivnih), kombinirali za mesta, operaterje/instrumente, dneve, serije reagentov in izvedbe sekvenciranja za izračun PNC. Dvostranski 95-odstotni intervali zaupanja (IZ), izračunani z metodo Wilsonove ocene.

Majhne variante DNK

[Preglednica 59](#) prikazuje PPC za tarčne majhne variante DNK. PPC-ji so se gibali od 91,3 % za BRAF SNV do 100 % za večino majhnih variant DNK.

Preglednica 59 PPC testa TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje majhnih variant DNK v kombiniranih tarčnih članih panela

Raven opaženih variant ¹	Vrsta različice	Tarčna varianta (nukleotid)	Tarčna varianta (aminokislina)	Povprečni VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % IZ ³
~2– 3 × LoD	DELECIJA	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2– 3 × LoD	DELECIJA	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2– 3 × LoD	INSERCIJA	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
~2– 3 × LoD	INSERCIJA	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2 × LoD	INSERCIJA	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2– 3 × LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2– 3 × LoD	DELECIJA	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2– 3 × LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2– 3 × LoD	DELECIJA	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2– 3 × LoD	INSERCIJA	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)

Raven opaženih variant ¹	Vrsta različice	Tarčna varianta (nukleotid)	Tarčna varianta (aminokislina)	Povprečni VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % IZ ³
~2– 3 × LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2– 3 × LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2– 3 × LoD	INSERCIJA	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2– 3 × LoD	DELECIJA	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2 × LoD	INSERCIJA	chr17_7578470_C_CGGGGCGGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2– 3 × LoD	INSERCIJA	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Raven variant, izračunana iz povprečne opažene variantne frekvence alelov.

² Povprečna variantna frekvenca alelov, izračunana iz opaženih rezultatov testa.

³ Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja, izračunan z metodo Wilsonove ocene.

PNC-ji so bili 100 % v vseh majhnih variantah DNK.

Preglednica 60 prikazuje analizo komponent variance rezultatov VAF za vsak vir variacije in skupno variacijo pri vseh članih panela s tarčnimi majhnimi variantami DNK.

Preglednica 60 Analiza komponent variance VAF za tarčne majhne variante DNK

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

Obstajata dve tarčni majhni varianti DNK, za kateri je bilo število opazovanj premajhno za prilagoditev modela komponent variance. Za ti dve tarčni varianti so bili skupni SD 0,027 za varianto chr1_27024001_CG in 0,001 za varianto chr17_7578470_CGGGCGGG.

Pomnožitve genov

[Preglednica 61](#) prikazuje PPC za pomnožitve tarčnega gena. PPC so bili 100,0 % za MET in 100,0 % za ERBB2.

Preglednica 61 PPC testa TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje pomnožitve genov pri kombiniranih tarčnih članih panela

Raven opaženih variant ¹	Tarčna varianta	Povprečna opažena večkratna sprememba ²	Odstotek pozitivnih določitev (%)	95 % IZ ³
~2–3 × LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3 × LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Raven variante, izračunana iz povprečne opažene večkratne spremembe.

² Povprečna večkratna sprememba, izračunana iz opaženih rezultatov testa.

³ Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja, izračunan z metodo Wilsonove ocene.

PNC so bili 100 % za pomnožitve genov.

[Preglednica 62](#) prikazuje analizo komponent variance za rezultate večkratne spremembe za vsak vir variacije in skupno variacijo pri vseh članih panela s tarčnimi pomnožitvami gena.

Preglednica 62 Analiza komponent variance večkratnih sprememb za tarčne pomnožitve genov

Tarčna varianta	N	Povprečna večkratna sprememba	SD mesta (% KV)	SD operaterja (mesto) (% KV)	SD dneva (mesto, operater) (% KV)	SD serije (% KV)	SD izvedbe (% KV)	Skupni SD (% KV)
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

Preglednica 63 prikazuje PPC za tarčne MSI-visoke člane panela. PPC je bil 100 % za oba MSI-visoka člana panela.

Preglednica 63 PPC testa TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje statusa MSI-visoko pri članih združenega tarčnega panela

Član panela	Povprečna ocena MSI ¹	N	Odstotek pozitivne določitve (PPC) (%)	95 % IZ 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)
Vsi člani		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Povprečna opažena ocena MSI, izračunana iz opazovanih rezultatov testa.

² Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja, izračunan z metodo Wilsonove ocene.

Preglednica 64 prikazuje analizo komponent variance ocene MSI za vsak vir variacije in skupno variacijo pri vseh članih panela, tarčnih za status MSI-visok.

Preglednica 64 Analiza komponent variance ocene MSI za člane panela, tarčne za status MSI-visok

Član panela	N	Povprečna ocena MSI	SD mesta (% KV)	SD operaterja (mesto) (% KV)	SD dneva (mesto, operater) (% KV)	SD serije (% KV)	SD izvedbe (% KV)	Skupni SD (% KV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

Za oceno ponovljivosti rezultatov TMB je bila izvedena kvantitativna analiza rezultata pri tarčnih članih panela TMB, ki so predstavljali razpon pričakovanih rezultatov TMB. **Preglednica 65** prikazuje analizo komponent variance rezultatov TMB za vsak vir variacije in skupno variacijo pri vseh članih panela TMB. Skupni SD za rezultat TMB so bili 1,0 (% KV = 13) za enega člana panela (povprečen rezultat TMB = 7,6) in 1,1 (% KV = 2) za drugega člana panela (povprečen rezultat TMB = 63,2).

Preglednica 65 Analiza komponent variance TMB za tarčne člane panela TMB

Član panela*	N	Povprečna ocena TMB	SD mesta (% KV)	SD operaterja (mesto) (% KV)	SD dneva (mesto, operater) (% KV)	SD serije (% KV)	SD izvedbe (% KV)	Skupni SD (% KV)
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)

* Za enega člana panela TMB je bilo število opazovanj premajhno (N = 2) za prilagoditev modela komponent variance. Za tega člana je bil skupni SD 1,7.

Variante RNK

[Preglednica 66](#) prikazuje PPC za tarčne majhne variante RNK. PPC-ji so v razponu od 91,7 % za KIF5B-RET do 100 % za večino variant RNK.

Preglednica 66 PPC testa TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje variant RNK v kombiniranih tarčnih članih panela

Raven opaženih variant ¹	Vrsta različice	Tarčna varianta	Povprečje podpornih odčitkov ²	PPC (%) (n/N)	95 % IZ ³
> 3 × LoD	Fuzija	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzija	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzija	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzija	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzija	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzija	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzija	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3 × LoD	Fuzija	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzija	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzija	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuzija	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzija	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzija	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuzija	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2 × LoD	Fuzija	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
	Fuzija	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
> 3 × LoD	Fuzija	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Spojitevna varianta	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3 × LoD	Spojitevna varianta	preskok eksona 14 MET	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Raven variante, izračunana iz povprečja opaženih podpornih odčitkov.

² Povprečje podpornih odčitkov, izračunano iz opaženih rezultatov testov.

³ Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja, izračunan z metodo Wilsonove ocene.

PNC je bil 100 % za vsako tarčno varianto RNK, razen za fuzijo FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60 % (984/988; 95 % IZ: 98,96 % do 99,84 %).

[Preglednica 67](#) prikazuje analizo komponent variance rezultatov podpornih odčitkov za vsak vir variacije in skupno variacijo pri vseh članih panela s tarčnimi variantami RNK.

Preglednica 67 Analiza komponent variance podpornih odčitkov za tarčne variante RNK

Tarčna varianta	N	Povprečje podpornih odčitkov	SD mesta (% KV)	SD operaterja (mesto) (% KV)	SD dneva (mesto, operater) (% KV)	SD serije (% KV)	SD izvedbe (% KV)	Skupni SD (% KV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPPSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
Spojitevna varianta EGFR	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Spojitevna varianta s preskokom eksona 14 MET	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Natančnost znotraj laboratorija

Izvedeni sta bili dve študiji za oceno natančnosti znotraj laboratorija za TSO Comprehensive (EU). Študija 1 je ocenila fuzije NTRK in RET ter majhne variante DNK RET. Študija 2 je ocenila TMB in MSI.

Študija 1

Natančnost znotraj laboratorija so ocenili za fuzije NTRK1-3 (gliom manjšega stadija, multififormni glioblastom, miofibroblastni sarkom, sekretorni rak dojke), fuzije RET (rak ščitnice in kožno tkivo neznanega raka) in majhne variante DNK RET (medularni rak ščitnice) s tkivi FFPE iz navedenih rakov. Vsak vzorec je bil testiran na dveh ravneh variant: ~1 × LoD (nizka raven variante) in ~2–3 × LoD (visoka raven variante), razen za vzorec, ki

vsebuje CCDC6-RET, ki je bil testiran samo na nizki ravni variante. Vsak vzorec na vsaki testni ravni je bil v vsakem dogodku priprave knjižnice izveden v dvojnikih pri treh (3) operaterjih. Vsak operater je začel s pripravo knjižnice na tri (3) nezaporedne začetne dneve in sekvenciral na treh (3) za to določenih instrumentih NextSeq 550Dx. Testirane so bile tri (3) serije reagentov, ki so ustvarile 54 opažanj na raven. Nekatere ravni so imele manj kot 54 opažanj zaradi neveljavnih knjižnic.

Kvalitativna analiza

Kvalitativna skladnost določanja variant je bila ocenjena ločeno za dve ravni variant za dano varianto iz združenih opazovanj za vse spremenljivke (operaterji, serije reagentov, instrumenti, dnevi in replikati). PPC-ji in PNC-ji ter povezani dvostranski 95-odstotni interval zaupanja (Wilsonova ocena) so povzeti v [Preglednica 68](#) (majhne variante DNK) in [Preglednica 69](#) (fuzije RNK).

Na visoki ravni variant ($\sim 2-3 \times \text{LoD}$) je test TSO Comprehensive (EU) pokazal 100 % za PPC in PNC za vse testirane variante.

Na nizki ravni variant ($\sim 1 \times \text{LoD}$) je PPC za majhne variante DNK znašal od 83,3 % do 98,1 %, PPC za fuzijo RNK pa od 90,7 % do 100 %. Za variante s PPC < 95 % so bili povprečni VAF (RET C634Y in RET D898_E901del) ali podporni odčitki (NCOA4-RET in BCAN-NTRK1) pod ustreznimi mejami zaznavnosti. Na nizki stopnji variant je bil dosežen 100-odstotni PNC za vse variante.

Preglednica 68 Kvalitativni rezultati za tarčne variante DNK

Raven variante	Variantna	Vrsta različice	Povprečni VAF	PPC (%) (n/N) 95 % IZ	PNC (%) (n/N) 95 % IZ
$\sim 1 \times \text{LoD}$	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3, 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	DELECIJA	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*	DELECIJA	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Raven variante	Varianta	Vrsta različice	Povprečni VAF	PPC (%) (n/N) 95 % IZ	PNC (%) (n/N) 95 % IZ
~3 × LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	DELECIJA	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*	DELECIJA	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Nukleotidne spremembe so navedene za vsako varianto v razdelku Meja zaznavnosti, razen za RET D631_L633delinsE, ki je kromosom 10, položaj 43609940, referenca ACGAGCT, alternativa A.

Preglednica 69 Kvalitativni rezultati za tarčne fuzije RNK

Raven variante	Fuzija	Povprečje podpornih odčitkov	PPC (%) (n/N) 95 % IZ	PNC (%) (n/N) 95 % IZ
~1 × LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (celične linije FFPE)	23,1	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	
	KANK1-NTRK3	13,5	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	NCOA4-RET	13,3	90,7 (49/54) (80,1, 96,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	CCDC6-RET	18,7	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorec 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorec 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Raven variante	Fuzija	Povprečje podpornih odčitkov	PPC (%) (n/N) 95 % IZ	PNC (%) (n/N) 95 % IZ
~2–3 × LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE celična linija)	28,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	
	KANK1-NTRK3	39,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	NCOA4-RET	24,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	CCDC6-RET	Ni na voljo	Ni testirano	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorec 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (vzorec 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kvalitativna analiza

Za oceno celotne variacije osnovne zvezne spremenljivke (VAF za majhne variante DNK in podporni odčitki za fuzije RNK) in oceno komponent natančnosti [standardna deviacija (SD), koeficient variacije (KV)] za vsak vir variacije [operaterji, instrumenti, dnevi, serije reagentov, ostalo in skupni seštevek] je bila izvedena analiza komponent variance z omejeno največjo verjetnostjo (REML). Rezultati za majhne variante DNK so predstavljeni v [Preglednica 70](#). za fuzije RNK pa v [Preglednica 71](#).

Variacija VAF se je povečala s povprečjem, kot je pričakovano pri binomskem deležu. Variacija v podpornih odčitkih se je povečala s povprečjem, kot je pričakovano pri podatkih štetja. Preostala komponenta je največ

prispevala k skupni varianci za majhne variante DNK in fuzije RNK na obeh ravneh, kar podpira sklep, da je zaznavanje teh variant s testom TSO Comprehensive (EU) robustno glede na operaterje, serije, instrumente in dneve.

Preglednica 70 Kvantitativni rezultati SD in KV za tarčne majhne variante DNK

Raven VAF	Varianta	Vrsta različice	N veljavnih poskusov	Povprečni VAF	SD operaterja (% KV)	SD instrumenta (% KV)	SD serije (% KV)	SD dneva (% KV)	Preostala SD (% KV)	Skupni SD (% KV)
~1 × LoD	RET D898_E901del	DELECIJA	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	DELECIJA	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)
~3 × LoD	RET D898_E901del	DELECIJA	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	DELECIJA	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)

Preglednica 71 Kvantitativni rezultati SD in KV za tarčne fuzije RNK

Raven podpornih odčitkov	Fuzija	N veljavnih poskusov	Povprečne podpornih odčitkov	SD operaterja (% KV)	SD instrumenta (% KV)	SD serije (% KV)	SD dneva (% KV)	Preostala SD (% KV)	Skupni SD (% KV)
~1 × LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (celična linija)	54	23,1	4,55 (20)	1,18 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,73 (29)	8,21 (36)
	KANK1-NTRK3	54	13,5	0,74 (5)	0,11 (1)	1,09 (8)	0,00 (0)	4,22 (31)	4,42 (33)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,67 (13)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,67 (13)	5,09 (38)	5,61 (42)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,00 (0)	1,14 (6)	5,44 (29)	0,00 (0)	6,17 (33)	8,30 (44)
	KIF5B-RET (vzorec 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (vzorec 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Raven podpornih odčitkov	Fuzija	N veljavnih poskusov	Povprečje podpornih odčitkov	SD operaterja (% KV)	SD instrumenta (% KV)	SD serije (% KV)	SD dneva (% KV)	Preostala SD (% KV)	Skupni SD (% KV)
2–3 × LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (celična linija)	54	28,3	7,93 (28)	1,02 (4)	0,00 (0)	0,00 (0)	9,05 (32)	12,08 (43)
	KANK1-NTRK3	54	39,2	5,10 (13)	0,00 (0)	4,78 (12)	0,00 (0)	9,44 (24)	11,74 (30)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,05 (12)	0,00 (0)	5,92 (24)	0,00 (0)	6,78 (27)	9,50 (38)
	KIF5B-RET (vzorec 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (vzorec 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Študija 2

Za TMB in MSI je bila ocenjena natančnost znotraj laboratorija. Za ocenjevanje natančnosti na različnih ravneh v celotnem razponu ocen so uporabili pet vzorcev DNK NSCLC FFPE za TMB in sedem vzorcev CRC FFPE za MSI, vključno z MS-stabilnimi in MSI-visokimi. Vsak vzorec je bil analiziran v dvojniku s tremi (3) operaterji, tri (3) dni, s tremi (3) pripravami knjižnic za tri (3) serije reagentov z uporabo treh instrumentov NextSeq 550Dx, kar je ustvarilo 54 opazovanj na raven.

Kvalitativna skladnost je bila ocenjena glede na status MSI. Test TSO Comprehensive (EU) je pokazal 100-odstotno skladnost za odstotek pozitivnih in odstotek negativnih določitev za status MSI. Za TMB test TSO Comprehensive (EU) poroča oceno TMB; kvalitativna skladnost ni veljavna.

Skupna variacija ocen TMB in MSI, skupaj s prispevkom po viru (instrumenti, operaterji, serije, dnevi in ostalo), je bila kvantificirana z uporabo modela komponent variance v različnih ocenah. Standardna deviacija (SD) in koeficient variacije (KV) sta predstavljena v [Preglednica 72](#) za TMB in [Preglednica 73](#) za MSI po ravneh. Nekatere ravni so imele manj kot 54 opazanj zaradi neveljavnih knjižnic.

Preglednica 72 SD in KV kvantitativne ocene TMB

Raven	Povprečna ocena TMB	N veljavnih poskusov	SD operaterja (% KV)	SD instrumenta (% KV)	SD serije (% KV)	SD dneva (% KV)	Preostala SD (% KV)	Skupna SD (% KV)
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)

Preglednica 73 SD in KV kvantitativne ocene MSI

Status MSI	Raven	Povprečna ocena MSI (%)	N veljavnih poskusov	SD operaterja (% KV)	SD instrumenta (% KV)	SD serije (% KV)	SD dneva (% KV)	Preostala SD (% KV)	Skupna SD (% KV)
MS-stabilen	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-visoka	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)

Variacije v ocenah TMB se povečujejo s povprečjem, kot je pričakovano iz teoretičnih porazdelitev podatkov o številu. Razlike v ocenah MSI za ravni blizu ocene MSI = 50 so večje od variacije rezultatov MSI, ki so bližje 0 ali 100, kar je v skladu s spremenljivostjo teoretičnih porazdelitev podatkov o deležih. Preostala komponenta je ostala največji prispevek k skupni varianci za ocene MSI in TMB, kar podpira sklep, da so ocene robustne za operaterje, serije, instrumente in dneve. Vendar sta tako MSI kot TMB kompleksna biološka označevalca, analitična učinkovitost pa se lahko razlikuje od vzorca do vzorca. To pomeni, da je variacija TMB odvisna ne samo od vrednosti TMB, temveč tudi od sestave variant v vzorcu, kot so vrsta variante (SNV, indel) in raven VAF (bližina meje vključitve). Podobno je variacija MSI odvisna ne le od vrednosti MSI, temveč tudi od sestave mest v vzorcu, kot je število nestabilnih mest in pomen nestabilnosti na mesto.

Vrednosti C5 in C95 okoli mejne vrednosti 20,00 % so bile za MSI določene s profilom natančnosti ([Preglednica 74](#)).

Preglednica 74 Interval C5–C95 za MSI

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

Ocenjen je bil vpliv vsebnosti tumorja na rezultate TMB in MSI. Za večino vzorcev je imela vsebnost tumorja ≥ 30 % zanemarljiv vpliv na ocene TMB nad približno 10 mutacij na megabazo. Ocene TMB so ostale relativno nespremenjene z naraščajočo vsebnostjo tumorja. Pri MSI-visokih vzorcih je vsebnost tumorja pokazala pozitivno, linearno korelacijo z oceno MSI. MSI-visoki vzorci so ostali v povprečju MSI-visoki, ko je bila vsebnost tumorja ≥ 30 %. Vzorci endometrija so se obnašali izrazito drugače kot druge vrste tkiv in ugotovili so, da potrebujejo večjo količino vsebine tumorja, da bodo določeni kot MSI-visoki.

Točnost profiliranja tumorja

Zaznavanje variant s testom TSO Comprehensive (EU) so primerjali z rezultati referenčnih metod. Majhne variante DNK in TMB so primerjali z zunanjo validirano metodo NGS celotnega eksoma. Pomnožitve genov so primerjali z isto metodo NGS za celotni eksom ali validirano metodo dvojne hibridizacije in situ (DISH) za pomnožitve HER2. MSI so ocenjevali s potrjenim testom MSI-PCR. Spojitvene variante RNK so primerjali z

validirano kvantitativno metodo PCR (qPCR). Fuzije ROS1 in ALK so primerjali z validiranimi testi FISH. Vse druge fuzije so primerjali s kompozitno metodo, sestavljeno iz validiranega testa NGS za celotne eksome RNK (RNGS1), tarčnega panela NGS (RNGS2) in kapljične digitalne PCR (ddPCR).

Zaznavanje majhnih variant DNK

Zaznavanje majhnih variant DNK s testom TSO Comprehensive (EU) so primerjali z rezultati sekvenciranja celotnih eksomov (WES), ki uporablja WES z ujemajočimi se pari normalnih vzorcev tumorja za določanje majhnih variant zarodne linije in somatskih. Primerjava med majhnimi variantami iz variant posameznega nukleotida (SNV), insercij in delecij, je temeljila na 124 vzorcih iz 14 različnih vrst tkiva, ki so veljale tako za TSO Comprehensive (EU) kot tudi za WES. Test TSO Comprehensive (EU) lahko zazna multinukleotidne variante (MNV-ji, 2–3 bp), ki zahtevajo faziranje, test WES pa jih ne more. TSO Comprehensive (EU) MNV-ji so bili ocenjeni kot posamezni SNV glede na WES. Povzetek skladnosti na ravni variante, vključno z odstotkom pozitivnega ujemanja (PPA) in odstotkom negativnega ujemanja (NPA) za vse določitve variant, je prikazan v [Preglednica 75](#).

Preglednica 75 Povzetek skladnosti za določitve majhnih variant, ocenjene s statusom zarodne linije ali somatske

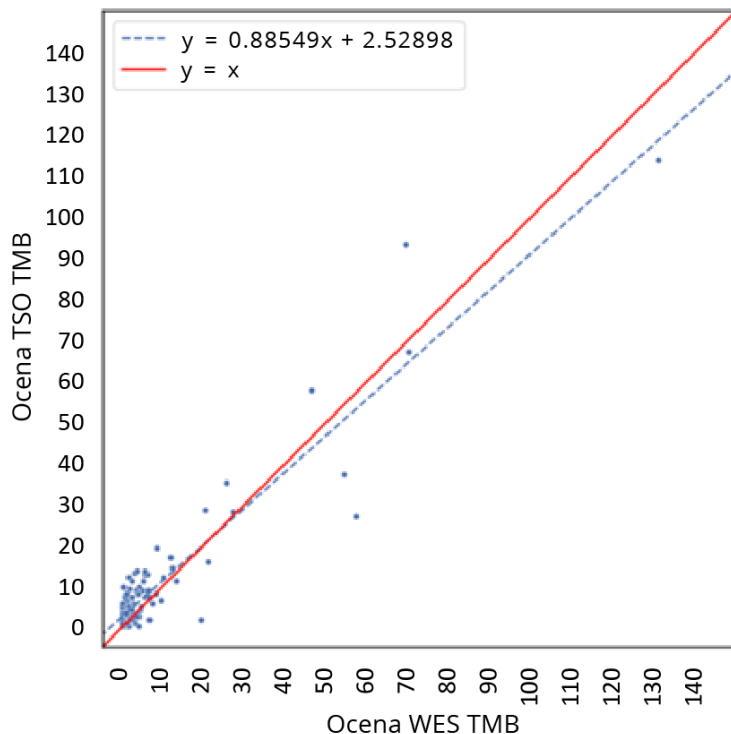
	Določeno kot somatsko z WES	Določeno kot zarodna linija z WES	Ni določeno z WES
Določeno z TSO Comprehensive (EU)	382	33.163	426
Ni določeno z TSO Comprehensive (EU)	69	61	70.000.481
Skupno	451	33.224	70.000.907
Odstotek ujemanja	PPA: 85 % (382/451), 95 % IZ: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33.163/33.224) 95 % IZ: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70.000.481/70.000.907) 95 % IZ: [99,999 %, 99,999 %]

Skupno je TSO Comprehensive (EU) določil 426 variant, ki niso bile zaznane z metodo WES. Dvesto štiri (48 %) teh variant je imelo frekvenco variantnega alela pod pragom za določanje z metodo WES. Od preostalih potencialno lažno pozitivnih variant so bili dokazi o določitvi variante z metodo WES z nizko podporo. Prav tako so imele številne variante zelo nizke dokaze z WES v ujemajočih se normalnih vzorcih. Ta rezultat kaže, da so bile te variante v tumorju spregledane z WES zaradi kontaminacije s tumorjem v normalnem.

Zaznavanje mutacijskega bremena tumorja

Skladnost TMB je bila določena s primerjavo ocene TMB (somatske mutacije/megabaza) med metodo WES in TSO Comprehensive (EU) za 124 vzorcev z razpoložljivimi podatki tako za TSO Comprehensive (EU) kot tudi za WES. Linearna regresijska analiza z WES kot napovedovalcem je imela presečišče y 2,53, naklon 0,89 in Pearsonov korelacijski koeficient 0,94 ([Slika 3](#)).

Slika 3 Korelacije ocene TMB med metodama WES in TSO Comprehensive (EU)



Zaznavanje pomnožitve genov

Zaznavanje pomnožitve genov s testom TSO Comprehensive (EU) so primerjali z rezultati istega testa WES, pri čemer so bili uporabljeni ujemajoči se pari tumor–normalno tkivo ali samo tumorski vzorci. Skupno je bilo 420 vzorcev, od katerih so pri 183 uporabili ortogonalno metodo tumor-normalnega tkiva, pri 237 pa metodo samo s tumorskimi vzorci. Od 420 vzorcev je bilo za študijo izbranih 50 vzorcev, ki so bili pozitivni na pomnožitev s testom TSO Comprehensive (EU) ali predhodnim testom. Uspešnost za te karakterizirane vzorce je bila prilagojena z uporabo povprečne prevalece fuzij. Združena uspešnost za karakterizirane in nekaracterizirane vzorce je bila izračunana kot povprečje, tehtano z inverzno varianco. Vzorci so bili iz 14 vrst tkiv in so vsebovali pomnožitve iz 55 genov. TSO Comprehensive (EU) poroča o pomnožitvah genov iz genov MET in ERBB2. Točnost je bila ocenjena za vseh 55 genov. Povzetek določitev za pomnožitev genov je prikazan v [Preglednica 76](#).

Preglednica 76 Povzetek skladnosti za pomnožitve genov

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

* Interval zaupanja, izračunan s korakom ponovnega vzorčenja (bootstrap).

Pomnožitve ERBB2 (HER2) v tkivih želodca in dojke so analizirali ločeno od drugih pomnožitev genov z metodo dvojne hibridizacije in situ (DISH). Skupno je bilo testiranih 116 vzorcev dojke in želodca, od katerih je bilo 64 predhodno označenih kot HER2-pozitivnih z metodo IHC ali FISH. En vzorec ni bil uspešno ekstrahiran, 4 vzorci niso bili veljavni za TSO Comprehensive (EU), 3 vzorci pa niso bili veljavni za test DISH. Od 108 vzorcev jih je 20 (18,5 %) imelo mejne ocene (med 1,5 in 2,5) blizu mejne vrednosti DISH 2,0. Rezultati skladnosti, vključno s PPA, NPA za vse vzorce in brez mejnih primerov HER2 DISH, so prikazani v [Preglednica 77](#).

Preglednica 77 Povzetek skladnosti med testoma TSO Comprehensive in HER2 DISH, vključno za pomnožitev gena HER2

Pomnožitev gena HER2 Vsi (dojka in želodec)	Pomnožitev HER2 z DISH	Brez pomnožitve HER2 z DISH
Pozitivno pri TSO Comprehensive (EU)	17 (vključno z 1 mejnim)	13 (vključno z 1 mejnim)
Negativno pri TSO Comprehensive (EU)	10 (vključno s 6 mejnimi)	68 (vključno z 12 mejnimi)
Odstotek ujemanja, vključno z mejnimi primeri	PPA: 63 % (17/27) 95 % IZ: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % IZ: [74 %, 90 %]
Odstotek ujemanja brez mejnih primerov	PPA: 80 % (16/20) 95 % IZ: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % IZ: [72 %, 90 %]

Zaznavanje mikrosatelitne nestabilnosti

Zaznavanje mikrosatelitne nestabilnosti s testom TSO Comprehensive (EU) so primerjali z rezultati validiranega testa MSI-PCR, ki za testiranje uporablja ujemajoče se pare tumor-normalni vzorec. Primerjali so skupno 195 vzorcev, ki so izpolnjevali zahtevo po vsebnosti tumorja ≥ 30 % (za status MS-stabilen) in so predstavljali 14 vrst tkiva. MSI-PCR ocenjuje 5 mest in ima 3 izide – MSI-stabilen (brez nestabilnih mest), MSI-majhen (eno nestabilno mesto) in MSI-velik (dve ali več nestabilnih mest). TSO Comprehensive (EU) ocenjuje do 130 mikrosatelitnih mest in razvršča vzorce le kot MS-stabilen ali MSI-velik (≥ 20 % nestabilnih mest). Izidi MSI-majhen so bili za MSI-PCR združeni z izidi MS-stabilen. Analiza skladnosti je prikazana v [Preglednica 78](#).

Preglednica 78 Povzetek analize skladnosti med testom TSO Comprehensive (EU) in MSI-PCR za mikrosatelitno nestabilnost DNK

Stanje MSI	MSI-velik s PCR	MSI-majhen s PCR	MSI-stabilen s PCR
Nestabilen s testom TSO Comprehensive (EU) (MSI-velik)	41	2	0
Stabilen s testom TSO Comprehensive (EU) (MS-stabilen)	3	0	150
Skupno	44	2	150
Odstotek ujemanja	PPA: 93 % (41/44) 95 % IZ: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % IZ: [95 %, > 99 %]	

Zaznavanje spojitvenih variant RNK

Natančnost zaznavanja spojitvenih variant je bila izračunana s primerjavo rezultatov TSO Comprehensive (EU) s testi qPCR za preskok eksona 14 EGFRvIII in MET, vključno z eno znano pozitivno RNK za vsako od spojitvenih variant. Analiza skladnosti je bila izvedena na skupno 230 edinstvenih FFPE vzorcih RNK iz 14 vrst tkiv z razpoložljivimi podatki tako z TSO Comprehensive (EU) kot tudi z referenčno metodo. Vsi vzorci so bili testirani za preskok eksona 14 MET, EGFRvIII pa je bil testiran samo v možganskem tkivu. Trije vzorci, z metodo qPCR določeni kot pozitivni za preskok eksona 14 MET, s testom TSO Comprehensive (EU) pa ne, so imeli povprečni Ct > 37 in so bili pod ravno LoD testa TSO Comprehensive (EU). [Preglednica 79](#) povzema rezultate študije skladnosti.

Preglednica 79 Povzetek analize skladnosti med testom TSO Comprehensive (EU) in testom qPCR za spojitvene variante RNK

Spojitvene variante RNK	Pozitivno s qPCR	Negativno s qPCR
Pozitivno z TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	3	0
Negativno pri TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	0	13
Pozitivno pri TSO Comprehensive (EU) (preskok eksona 14 MET)	1	0
Negativno pri TSO Comprehensive (EU) (preskok eksona 14 MET)	3	217
Skupno	7	230
Odstotek ujemanja	PPA: 57 % (4/7) 95 % IZ: [25 %, 84 %]	NPA 100 % (230/230) 95 % IZ: [98 %, 100 %]

Zaznavanje fuzije RNK

Primerjava s kompozitno metodo

Fuzije TSO Comprehensive (EU) so primerjali s kompozitno metodo, sestavljeno iz sekvenciranja celotnih eksomov RNK z uporabo panela NGS (RNGS1), tarčne NGS panela fuzije (RNGS2) in kapljične digitalne PCR (ddPCR).

Metoda RNGS1 se prekriva z vsemi geni, za katere lahko test TSO Comprehensive (EU) zazna fuzije. Vendar je bila meja zaznavnosti metode RNGS1 4–8 × večja od meje zaznavnosti TSO Comprehensive (EU) na podlagi števila podpornih odčitkov, opaženih v prekrivajočih se določitvah fuzije. Zato je bila z metodo WES (RNGS1) uporabljena kompozitna metoda z dvema dodatnima metodama z večjo občutljivostjo, vendar z manj širine za fuzije.

Skupaj je bilo z RNGS1 testiranih 255 edinstvenih vzorcev RNK, ki predstavljajo 14 vrst tkiv in z uspešnimi metrikami testa TSO Comprehensive (EU). Dva vzorca sta bila neveljavna za vzorec KK RNGS1 in izključena iz dodatne analize. Od 82 fuzij, ki jih je določil test TSO Comprehensive (EU), so bili 4 izključeni iz vrednotenja zaradi neuspešne KK vzorca RNGS1, 7 dodatnih fuzij pa ni bilo mogoče določiti zaradi odsotnosti tarč v panelu RNGS1. Od preostalih 71 fuzij, določenih s testom TSO Comprehensive (EU), je RNGS1 potrdil 9 fuzij. RNGS1 je določil 4 fuzije, ki jih ni določil test TSO Comprehensive (EU).

Od 62 fuzij, ki so bile pozitivne s testom TSO Comprehensive (EU) in jih RNGS1 ni zaznal, se jih je 13 prekrivalo in jih je potrdil RNGS2. Eno fuzijo je določil RNGS2, test TSO Comprehensive (EU) pa ne.

Nato je bila uporabljena kapljična digitalna PCR za fuzije, določene s testom TSO Comprehensive (EU), ki niso bile določene ali jih RNGS1 ne more določiti, in jih RNGS2 ne more oceniti (49). Poleg tega je bil ddPCR uporabljen za ponovno oceno 2 od 4 lažno negativnih fuzij za test TSO Comprehensive (EU) z RNGS1 in 2 od 9 skladnih fuzij za test TSO Comprehensive (EU) in RNGS1. Za zagotovitev specifičnosti je bilo v testiranje vsakega pozitivnega fuzijskega vzorca vključenih pet vzorcev z negativnim rezultatom fuzije. Osemnajst fuzij ni bilo testiranih z ddPCR zaradi nezmožnosti oblikovanja začetnih oligonukleotidov/sond, več genskih partnerjev za fuzijo ali nezadostnega preostalega materiala FFPE. Za ddPCR so bili začetni oligonukleotidi in sonde zasnovani glede na opažene prelomne točke v testu TSO Comprehensive (EU).

Skupaj je metoda ddPCR zaznala 52 fuzij, od tega jih je 41 določil test TSO Comprehensive (EU) vendar jih ni določil ali niso določljive z RNGS1. Devet fuzij je bilo določenih z ddPCR, vendar negativnih s testom TSO Comprehensive (EU) ali z RNGS1. Dve pozitivni fuziji z ddPCR sta potrdili 2 skladni fuziji za test TSO Comprehensive (EU) in RNGS1. Z ddPCR ni bilo zaznane fuzije pri dveh ponovno ocenjenih s testom TSO Comprehensive (EU) lažno negativnih rezultatih z RNGS1. Vendar sta bila ta rezultata na podlagi primerjave z RNGS1 šteta kot lažno negativna.

Od 255 vzorcev je bilo za študijo izbranih 35 vzorcev, ker so bili pozitivni na fuzijo s testom TSO Comprehensive (EU) ali predhodnim testom. Uspešnost za te karakterizirane vzorce je bila prilagojena z uporabo povprečne prevalece fuzij. Združena uspešnost za karakterizirane in nekarakterizirane vzorce je bila izračunana kot povprečje, tehtano z inverzno varianco. Rezultati kompozitne skladnosti za fuzije so prikazani v [Preglednica 80](#).

66 fuzij (54 edinstvenih fuzij), skladnih s kompozitno metodo, je predstavljalo 43 genov v panelu TSO Comprehensive (EU). Vendar pa so fuzije primerne za do poročanje le iz 23 genov, navedenih v [Preglednica 80](#).

Preglednica 80 Povzetek skladnosti za fuzije RNK

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

* Interval zaupanja, izračunan s korakom ponovnega vzorčenja (bootstrap).

Primerjava z metodo FISH za fuzije ROS1 in ALK

Z metodo FISH je bilo testiranih petindvajset vzorcev NSCLC tako za fuzijo ROS1 kot tudi za fuzijo ALK, pet dodatnih vzorcev NSCLC pa za ROS1 fuzijo. Osem vzorcev ni imelo rezultata z metodo FISH za ROS1 zaradi neustreznega tkiva. Dve fuziji ROS1 in eno ALK sta zaznala tako TSO Comprehensive (EU) kot tudi FISH. Neskladnih rezultatov niso opazili. [Preglednica 81](#) povzema rezultate skladnosti metod TSO Comprehensive (EU) in FISH za fuzije ROS1 in ALK.

Preglednica 81 Povzetek rezultatov skladnosti metode TSO Comprehensive (EU) in FISH za fuzije ROS1 in ALK

ALK+ROS1	Pozitivno z metodo FISH	Negativno z metodo FISH
Pozitivno z TSO Comprehensive (EU)	3	0
Negativno z TSO Comprehensive (EU)	0	44
Skupno	3	44
Odstotek ujemanja	PPA: 100 % (3/3) 95 % IZ: [44 %, 100 %]	NPA 100 % (44/44) 95 % IZ: [92 %, 100 %]

Veljavnost vzorca

Veljavnost vzorca (prvi poskus) so izmerili za 181 edinstvenih vzorcev RNK in 272 edinstvenih vzorcev DNK iz blokov FFPE, starih ≤ 5 let. Ti vzorci so bili izbrani na podlagi vrste tkiva in razpoložljivega materiala; veljavnost testa ni bila znana. Metrika KK za knjižnico mora biti uspešna, da se vrsta variante šteje za veljavno. Veljavnost vzorca je bila ocenjena ločeno za vsako od variant (majhne variante DNK/TMB, MSI, pomnožitve genov, fuzije/spojitvene variante) in so prikazane v [Preglednica 82](#). Predvideno je dodatno zmanjšanje veljavnosti MSI za 1 % za bloke FFPE starosti ≤ 2 leti zaradi pošiljanja reagenta.

Preglednica 82 Veljavnost vzorca

Vrsta različice	Veljavnost vzorca
Fuzije/spojitvene variante (RNK)	76 %
Majhne variante DNK/TMB	75 %
MSI	72 %
Pomnožitev gena	94 %

Povzetek analitične validacije za zahteve tumorskega profiliranja.

Na podlagi podatkov o meji zaznavnosti, natančnosti, ponovljivosti in točnosti je TSO Comprehensive (EU) analitično validiran za naslednje:

- Majhne variante DNK – SNV-ji, MNV-ji, insercije in delecije.
- TMB
- MSI
- Pomnožitve genov MET in ERBB2 (HER2) (glejte [Preglednica 2](#)).
- 23 genov, za katere je mogoče zaznati fuzijo (glejte [Preglednica 2](#)).
- Spojitvene variante EGFR in MET (glejte [Preglednica 2](#)).

Klinična učinkovitost NTRK

Za validacijo testa TSO Comprehensive (EU) kot spremljevalne diagnostike (CDx) za izbiro bolnikov za zdravljenje z zdravilom VITRAKVI (larotrektinib) so bili testirani vzorci bolnikov, vključenih v klinična preskušanja z larotrektinibom (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, ki se skupaj imenujejo vzorci iz preskušanja z larotrektinibom) s presečnim datumom za podatke 15 JUL 2019, dopolnjeni s komercialno pridobljenimi vzorci tkiva FFPE, da bi podprli študijo natančnosti testa TSO Comprehensive (EU) in klinično premostitveno študijo.

NCT02122913 je bila multicentrična, odprta študija faze 1 s povečevanjem odmerka pri odraslih bolnikih z napredovalimi čvrstimi tumorji (vsi udeleženci), ki niso imeli raka, pozitivnega na fuzijo NTRK. Po delu študije, v katerem se je odmerek povečeval, so uvedli povečanje odmerka pri bolnikih z dokumentiranim rakom, pozitivnim na fuzijo NTRK, in pri bolnikih, za katere je raziskovalec menil, da bi jim lahko koristil visoko selektiven zaviralec TRK. NAVIGATE NCT02576431 je multicentrična, odprta študija košare faze 2 tipa „košara“ pri bolnikih, starih 12 let in več, z rekurentnimi napredovalimi čvrstimi tumorji z dokumentirano fuzijo NTRK, ki jo je ocenil zunanji laboratorij. SCOUT NCT02637687 je multicentrična, odprta študija v teku faze 1/2 pri pediatričnih bolnikih, starih od rojstva do 21 let, z napredovalimi čvrstimi tumorji ali primarnimi tumorji centralnega živčnega sistema (CNS).

Od bolnikov, pozitivnih na fuzijo NTRK, vključenih v študijo testa TSO Comprehensive (EU), jih je 164 tvorilo razširjeni primarni nabor za oceno učinkovitosti larotrektriniba (ePAS4).

Študija natančnosti za zaznavanje fuzij NTRK1, NTRK2, NTRK3

Natančnost testa TSO Comprehensive (EU) za zaznavanje fuzij NTRK (NTRK1, NTRK2 ali NTRK3) pri bolnikih s čvrstimi tumorji je bila dokazana z ocenjevanjem skladnosti rezultatov fuzije NTRK med testom TSO Comprehensive (EU) in validirano ortogonalno metodo na podlagi NGS.

Izvedena je bila retrospektivna, neintervencijska študija. Vzorci preskušanja larotrektriniba in dodatni vzorci so bili testirani s testom TSO Comprehensive (EU) na enem zunanjem mestu in z ortogonalno metodo v osrednjem laboratoriju. Natančnost določitev fuzije NTRK za test TSO Comprehensive (EU) je bila ocenjena glede na ortogonalno metodo. Izračunani so bili pozitivni odstotek ujemanja (PPA), negativni odstotek ujemanja (NPA) in povezani dvostranski 95-odstotni intervali zaupanja (CI).

Testiranih je bilo 516 vzorcev s testom TSO Comprehensive (EU) in/ali z ortogonalno metodo. Od teh vzorcev je bilo 499 testiranih z obema metodama. Sedemnajst od 516 vzorcev ni bilo testiranih z enim od testov zaradi neuspešne ekstrakcije, neznanega razloga (za ortogonalno metodo) ali odstopanja od protokola. Od 499 vzorcev, testiranih po obeh metodah, je bilo 170 (34,1 %) vzorcev larotrektriniba in 329 (65,9 %) dodatnih vzorcev.

V [Preglednica 83](#) je prikazana navzkrižna tabela rezultatov za 499 vzorcev. Od 499 vzorcev je imelo 85 vzorcev neveljavne rezultate testa TSO Comprehensive (EU). Od teh 85 jih je imelo 53 tudi neveljavne rezultate ortogonalne metode. Dodatnih sedem vzorcev je imelo neveljavne rezultate ortogonalne metode. Tako je 407 od 499 vzorcev imelo veljavne rezultate z obema metodama.

Preglednica 83 Študija natančnosti NTRK: Navzkrižna tabela rezultatov TSO Comprehensive (EU) v primerjavi z rezultati ortogonalne metode za zaznavanje fuzije NTRK

Rezultat testa TSO Comprehensive (EU)	Rezultat ortogonalne metode			
	Pozitivno za fuzijo NTRK	Negativno za fuzijo NTRK	Neveljavno	Skupno
Pozitivno za fuzijo NTRK	114	16	1	131
Negativno za fuzijo NTRK	4	273	6	283
Neveljavni*	4	28	53	85
Skupno	122	317	60	499

* neveljavni rezultati testa TSO Comprehensive (EU) izhajajo z ravni vzorcev in izvedb.

Analize ujemanja, razen in vključno z neveljavnimi rezultati testa TSO Comprehensive (EU), so prikazane v [Preglednica 84](#). Brez neveljavnih rezultatov testa TSO Comprehensive (EU) je bil PPA 96,6 % (114/118; 95 % IZ: 91,5 %–99,1 %) in NPA 94,5 % (273/289; 95 % IZ: 91,2 %–96,8 %).

Preglednica 84 Študija natančnosti NTRK: PPA in NPA testa TSO Comprehensive (EU) v primerjavi z rezultatom ortogonalne metode za zaznavanje fuzij NTRK

Merilo ujemanja	Izključitev neveljavnih rezultatov testa TSO Comprehensive (EU)		Vključno z neveljavnimi rezultati testa TSO Comprehensive (EU)	
	Ujemanje, % (n/N)	95 % IZ*	Ujemanje, % (n/N)	95 % IZ*
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 % IZ na podlagi (natančne) metode Clopper-Pearson.

Klinična premostitvena študija za odkrivanje fuzij NTRK1, NTRK2 in NTRK3

Klinična vrednost testa TSO Comprehensive (EU) za odkrivanje fuzij NTRK1, NTRK2 ali NTRK3 pri bolnikih s čvrstimi tumorji, ki bi lahko imeli koristi od zdravljenja z larotrektrinibom, je bila dokazana v klinični premostitveni študiji. Študija je bila izvedena za oceno klinične učinkovitosti testa TSO Comprehensive (EU) za odkrivanje bolnikov, pozitivnih na fuzije NTRK1, NTRK2 ali NTRK3, za zdravljenje z larotrektrinibom in za oceno skladnosti med testom TSO Comprehensive (EU) in lokalnimi testnimi (LT) metodami (ki se uporabljajo za določanje stanja fuzije NTRK za klinična preskušanja larotrektriniba).

Metode LT so vključevale NGS, fluorescenčno in situ hibridizacijo (FISH), verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in teste NanoString. Pri bolnikih z infantilnim fibrosarkomom, pri katerih je bila z metodo FISH ugotovljena dokumentirana translokacija ETV6, so sklepali na fuzije NTRK (ETV6 NTRK3). Večina od 235 bolnikov v preskušanju larotrektriniba z znanim stanjem fuzije NTRK je bila testirana z metodami NGS.

Od presečnega datuma pridobivanja podatkov 15. JULIJA 2019 je bilo vključenih 279 bolnikov. Od 279 bolnikov je bilo 208 pozitivnih na fuzijo NTRK. Od 208 pozitivnih bolnikov jih je 164 oblikovalo larotrektrinib ePAS4.

Primarni opazovani dogodek analize učinkovitosti larotrektriniba je bil celokupni delež odziva (overall response rate – ORR) po oceni neodvisne revizijske komisije (IRC) v združenem naboru podatkov iz treh kliničnih študij. ORR so ocenili na podlagi deleža bolnikov z najboljšim celokupnim odzivom potrjenega popolnega odziva ali potrjenega delnega odziva na podlagi meril RECIST, različica 1.1. ORR v larotrektrinib ePAS4 je bil 72,6 % (95 % IZ [65,1 %, 79,2 %]) in je vključeval bolnike s 16 različnimi vrstami tumorjev.

Bilanca vzorcev

Nabor vzorcev je vključeval predstavitev širokega nabora vrst tumorjev ter vzorce pediatričnih in odraslih bolnikov.

V študije larotrektriniba je bilo 15. JULIJA 2019 vključenih 279 bolnikov. Od teh je 235 bolnikov imelo znan status fuzije NTRK, kot je določen z metodo LT: 208 je bilo pozitivnih in 27 negativnih. Pri 44 bolnikih status fuzije NTRK ni bil znan, saj testiranje ni bilo potrebno za upravičenost bolnikov v fazah povečevanja odmerkov študij NCT02122913 in SCOUT NCT02637687. Za klinično premostitveno študijo testa TSO Comprehensive (EU) so bili primerni vzorci bolnikov v preskušanju larotrektriniba, vključenih 15. julija 2019, z znanim statusom fuzije NTRK (208 pozitivnih bolnikov in 27 negativnih bolnikov), in dodatni vzorci, za katere je bilo z reprezentativnimi metodami LT ugotovljeno, da so negativni na fuzijo NTRK.

Od 208 pozitivnih vzorcev iz preskušanja larotrektriniba jih je 154 imelo na voljo vzorec za testiranje s testom TSO Comprehensive (EU). Od tega jih je 138 doseglo veljavne rezultate. Petnajst vzorcev je bilo neveljavnih zaradi neuspešnih metric kontrole kakovosti sekvenciranja vzorcev, 1 vzorec pa ni bil testiran zaradi odstopanja od protokola. Od 27 negativnih vzorcev iz preskušanja larotrektriniba jih je 24 imelo na voljo vzorec za testiranje. Od tega jih je 22 imelo veljavne rezultate testa TSO Comprehensive (EU). Dva vzorca sta bila neveljavna zaradi neuspešnih metric kontrole kakovosti sekvenciranja vzorcev.

Dodatni vzorci so bili pregledani z eno od dveh reprezentativnih metod LT. Pridobljenih in pregledanih je bilo več kot 350 vzorcev glede vsebnosti tumorja. Od dodatnih vzorcev, ki so izpolnjevali zahteve za vzorce, je bilo 266 uspešno ekstrahiranih in zanje je bilo z reprezentativno metodo LT potrjeno, da so negativni na fuzijo NTRK. Od teh vzorcev je bilo 260 na voljo za test TSO Comprehensive (EU), od katerih jih je 222 imelo veljavne rezultate. 38 vzorcev je bilo neveljavnih zaradi neuspešnih metric sekvenciranja vzorcev ($n = 25$) ali neuspešne izvedbe sekvenciranja ($n = 13$). Skupni nabor negativnih na fuzijo NTRK je sestavljalo 222 dodatnih vzorcev in 22 vzorcev iz preskušanja larotrektriniba.

Rezultati skladnosti

Skupno je bilo s testom TSO Comprehensive (EU) testiranih 437 vzorcev. Med 208 bolniki, pozitivnimi na fuzijo NTRK, jih je bilo 153, ki so imeli na voljo vzorce in so jih testirali s testom TSO Comprehensive (EU), kar je dalo 138 veljavnih rezultatov in 15 neveljavnih rezultatov.

Ujemanje med rezultati testa TSO Comprehensive (EU) z rezultati metod LT, z neveljavnimi rezultati TSO Comprehensive (EU) ali brez njih, je prikazano v [Preglednica 85](#).

Preglednica 85 Klinična premostitvena študija NTRK: Skladnost med testom TSO Comprehensive (EU) in metodami LT za zaznavanje fuzij NTRK

Merilo ujemanja	Izključitev neveljavnih rezultatov testa TSO Comprehensive (EU)		Vključno z neveljavnimi rezultati testa TSO Comprehensive (EU)	
	% ujemanja (n/N)	95 % IZ*	% ujemanja (n/N)	95 % IZ*
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

* Dvostranski 95-odstotni IZ je bil izračunan z uporabo (natančne) metode Clooper-Pearson.

Analiza občutljivosti glede na manjkajoče rezultate testa TSO Comprehensive (EU) je pokazala robustnost analize ujemanja. Manjkajoči rezultati testa TSO Comprehensive (EU) za bolnike, pozitivne na fuzijo LT NTRK ($n = 70$), so bili imputirani z uporabo logističnega regresijskega modela. Ocene ujemanja, vključno z imputiranimi vrednostmi, so prikazane v [Preglednica 86](#).

Preglednica 86 Klinična premostitvena študija NTRK: Skladnost med testom TSO Comprehensive (EU) in metodami LT za zaznavanje fuzij NTRK vključno z imputiranimi vrednostmi za bolnike, pozitivne na LT, z manjkajočimi rezultati testa TSO Comprehensive (EU)

Merilo ujemanja	% ujemanja	95 % IZ*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Manjkajoči rezultati testa TSO Comprehensive (EU) za bolnike, negativne na fuzijo LT, niso bili imputirani.

* Dvostranski 95-odstotni IZ so bili izračunani na podlagi metode večkratne imputacije Boot. Metoda večkratne imputacije Boot je korak ponovnega vzorčenja, ugnезden v večkratni imputaciji (Schomaker in Heumann 2018).

Ujemanja med testom TSO Comprehensive (EU) in LT glede na vrsto metode (na primer NGS RNK, FISH) so prikazani v [Preglednica 87](#).

Preglednica 87 Klinična premostitvena študija NTRK: Skladnost med testom TSO Comprehensive (EU) in metodami LT za zaznavanje fuzij NTRK glede na vrsto metode LT

Vrsta metode LT	Merilo ujemanja	% ujemanja (n/N)	95 % IZ ¹
NGS DNK	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)
NGS RNK 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	Ni izračunano (1/1)	Ni izračunano
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Ni izračunano (0/0)	Ni izračunano
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Ni izračunano: za podskupine s številom vzorcev < 5 statistika ujemanja ni bila izračunana.

¹ Dvostranski 95-odstotni IZ je bil izračunan z uporabo (natančne) metode Clooper-Pearson.

² Vključuje metode NGS, ki uporabljajo samo RNK in tako DNK kot RNK.

Od 437 vzorcev, testiranih s testom TSO Comprehensive (EU), je 24 imelo neskladne rezultate z LT: 15 je bilo pozitivnih z LT in negativnih s testom TSO Comprehensive (EU), 9 pa negativnih z LT in pozitivnih s testom TSO Comprehensive (EU). Od 24 vzorcev z neskladnimi rezultati je bilo 8 testiranih z metodo NGS DNK LT, 14 z metodo NGS RNK LT in 2 z metodo FISH.

Validirana neodvisna metoda NGS je potrdila rezultate testa TSO Comprehensive (EU) v 14 od 24 vzorcev z neskladnimi rezultati. Za preostalih 10 vzorcev so bili rezultati testa TSO Comprehensive (EU) neskladni z metodo LT in neodvisno metodo NGS.

Rezultati klinične učinkovitosti

V kohorti ePAS4 je bila učinkovitost larotrektriniba v TSO Comprehensive (EU)-pozitivni, LT-pozitivni populaciji (97 bolnikov, ORR = 78,4 %, 95 % IZ [68,8 %, 86,1 %]) podobna učinkovitosti larotrektriniba pri celotni populaciji ePAS4 (164 bolnikov, ORR = 72,6 %, 95 % IZ [65,1 %, 79,2 %]) ([Preglednica 88](#)). Od 97 TSO Comprehensive (EU)-pozitivnih bolnikov v ePAS4 je 28 (28,9 %) bolnikov doseglo popoln odziv/kirurški popoln odziv, 48 (49,5 %) bolnikov pa je doseglo delni odziv.

Od 13 TSO Comprehensive (EU)-negativne, LT-pozitivne populacije je 1 (7,7 %) bolnik pokazal popoln odziv, 2 (15,4 %) pa delni odziv ob zdravljenju z larotrektrinibom.

Preglednica 88 Klinična premostitvena študija NTRK: ORR pri LT-pozitivnih bolnikih glede na LT in rezultate TSO Comprehensive (EU) v ePAS4

		Fuzija LT Pozitivno N = 164	TSO Comprehensive (EU) Pozitivno in LT- pozitivno N = 97	TSO Comprehensive (EU) Negativno in LT- pozitivno N = 13
Najboljši celokupni odziv, n (%)	Popoln odziv	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Kirurški popoln odziv	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Delni odziv	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabilna bolezen	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Napredna bolezen	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Ni mogoče oceniti	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Celokupni delež odziva	Število bolnikov, n	164	97	13
	Število bolnikov s CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR % (95 % IZ*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Okrajšave: CR = popoln odziv, PR = delni odziv, sCR = kirurški popoln odziv.

* Dvostranski 95-odstotni interval zaupanja je bil izračunan po (eksaktni) metodi Clopper-Pearson.

54 bolnikov je imelo manjkajoče rezultate testa TSO Comprehensive (EU).

Podatki iz te študije podpirajo varnost in učinkovitost testa TSO Comprehensive (EU), kadar se uporablja za identifikacijo bolnikov s trdnimi tumorji s fuzijami NTRK, ki bi lahko bili primerni za zdravljenje z larotrektrinibom.

Reference

1. Ameriško združenje za klinično onkologijo. www.asco.org. Dostop 3. oktobra 2016.
2. Evropsko združenje za medicinsko onkologijo. www.esmo.org. Dostop 3. oktobra 2016.

Zgodovina revizij

Revizija	Datum	Opis spremembe
Dokument št. 200007789 v08	Maj 2025	Odstranjen sklic na različice programske opreme in številke delov. Posodobljene omejitve postopka • Informacije o nekrotičnem tkivu. • Informacije o MSI vsebine tumorja. Posodobljeno: • Opomba NTC velja za knjižnice najm. in najv. • Oprema in materiali navajajo specifikacije centrifuge plošč in prirastke pipet. • Izračun presežka SPB z 1,05-krat na 1,15-krat. • Terminologija za delecijo eksona 14 MET na preskok eksona 14 MET. Dodano: • Opomba za SMB v Zajem tarč ena in dve. • Uvod v pripravo na sekvenciranje. • Dodatne informacije o ultrazvočni napravi. Dodana pojasnila in posodobljeni rezultati za značilnosti učinkovitosti: • Moteče snovi. • Točnost profiliranja tumorja in veljavnost vzorca. • Meja zaznavnosti študije 1 in 2. • Študija 1 natančnosti znotraj laboratorija • Študija ponovljivosti 2. • Informacije o stabilnosti knjižnice in shranjevanju knjižnice. • Meja slepega. Posodobljena jezik in slovnica.

Revizija	Datum	Opis spremembe
Dokument št. 200007789 v07	Januar 2024	• Dodane informacije v razdelku Omejitve postopka: • Zahteve glede vzorca nekrotičnega tkiva in vsebnosti tumorja za mutacije z MSI-visok in somatske gonilne mutacije. • Potencialne motnje zaradi hemoglobina. • Omejitve zaznavanja v genu RET in določanje fuzij izven označenih meja gena. • O delecijah gena ni poročil. • Posodobljeno za uporabo s programsko opremo TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager različice 2.3.7. • Dodane informacije za zahtevano, vendar ne priloženo opremo in materiale, vključno z dvema dodatnima konfiguracijama ultrazvočne naprave. • Posodobljeni podatki o biološkem vzorcu in vzorcu: • Vsebnost nekrotičnega tkiva. • Učinki proteinaze K in hemoglobina. • Shranjevanje vzorcev FFPE, pritrjenih na stekelca, in prečiščene nukleinske kisline. • Dodane informacije za izboljšanje rokovanja z reagentom, poteka dela in odpravljanja težav z neuspešno KK. • Dodan kontekst in pojasnilo k značilnostim delovanja: • Navzkrižna kontaminacija • Ocena kompleta za ekstrakcijo nukleinske kisline • Moteče snovi • Stabilnost nukleinske kisline in vzorcev FFPE, pritrjenih na stekelcih • Klinična učinkovitost NTRK • Posodobljena jezik in slovnica.
Dokument št. 200007789 v06	Februar 2023	• Dodatne izjave v razdelku Omejitve • Jezikovne posodobitve za konvencije, slovnico in jasnost • Popravek preglednic 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Izjava o prisotnosti oborin v reagentu FSM • Posodobljene specifikacije o cikličnem termostatu in koritu na seznamu Oprema in materiali
Dokument št. 200007789 v05	September 2022	Posodobljene preglednic ponovljivosti študije 2

Revizija	Datum	Opis spremembe
Dokument št. 200007789 v04	Junij 2022	• Dodani PN-ji modula za analizo TSO Comprehensive v2.3.5 • Odstranjeni PN-ji modula za analizo TSO Comprehensive v2.3.3 • Posodobljena terminologija v razdelku Meja slepega
Dokument št. 200007789 v03	April 2022	• Dodane informacije o značilnostih delovanja, povezane s fuzijami NTRK • Dodana oznaka SAMO ZA IZVOZ • Posodobljena izjava o predvideni uporabi z dodanim zahtevkom NTRK1-3 CDx • Razširjene informacije o komponentah izdelka, ki vključujejo PN-je komponent programske opreme
Dokument št. 200007789 v02	Februar 2022	• Popravek napake sklica na preglednico • Dodana omejitev, povezana s somatskimi variantami in variantami zarodne linije • Pojasnjeno besedilo glede zaznavanja pomnožitve genov
Dokument št. 200007789 v01	December 2021	• Posodobljene omejitve postopka • Pojasnjene specifikacije magnetnega stojala in cikličnega termostata na seznamih opreme in materialov
Dokument št. 200007789 v00	November 2021	Prva izdaja

Patenti in blagovne znamke

Ta dokument in vsebina v njem sta last družbe Illumina, Inc. in njenih podružnic (»Illumina«) ter sta namenjena le pogodbeno določeni uporabi njenih strank v povezavi z uporabo izdelkov, ki so opisani v tem dokumentu, in za noben drug namen. Tega dokumenta in vsebine v njem ne smete uporabljati ali distribuirati za kateri koli drug namen in/ali ju kakor koli drugače posredovati, razkriti ali razmnoževati brez predhodnega pisnega soglasja družbe Illumina. Illumina vam s tem dokumentom ne podeljuje nobene licence v okviru svojega patenta, blagovne znamke, avtorskih pravic ali pravic iz običajnega prava in nobenih podobnih pravic tretjih oseb.

Ustrezno kvalificirano in usposobljeno osebje mora natančno in dosledno upoštevati navodila v tem dokumentu, da zagotovi pravilno in varno uporabo izdelkov, opisanih v njem. Pred uporabo teh izdelkov morate v celoti prebrati vsebino tega dokumenta in se seznaniti z njo.

ČE NE PREBERETE VSEH NAVODIL V TEM DOKUMENTU IN JIH NE UPOŠTEVATE DOSLEDNO, LAHKO POVZROČITE OKVARO IZDELKOV, TELESNE POŠKODBE OSEB, VKLJUČNO Z UPORABNIKI IN DRUGIMI OSEBAMI, TER POŠKODBE DRUGE LASTNINE IN RAZVELJAVITE KAKRŠNO KOLI JAMSTVO, KI VELJA ZA IZDELKE.

ILLUMINA NE PREVZEMA NOBENE ODGOVORNOSTI ZA NEPRAVILNO UPORABO IZDELKOV, OPISANIH V TEM DOKUMENTU (VKLJUČNO Z NJIHOVIMI DELI IN PROGRAMSKO OPREMO).

© 2025 Illumina, Inc. Vse pravice so pridržane.

Vse blagovne znamke so last družbe Illumina, Inc. ali njihovih ustreznih lastnikov. Za informacije o določenih blagovnih znamkah glejte spletno mesto www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktne podatki



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 ZDA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (zunaj Severne Amerike)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Označevanje izdelka

Za popolno referenco simbolov, ki so prikazani na embalaži in označevanju izdelka, glejte razlago simbolov na spletnem mestu support.illumina.com na zavihku *Documentation* (Dokumentacija) za vaš komplet.