

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

Листовка

ЗА IN VITRO ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА. САМО ЗА ИЗНОС.

Предназначение

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

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

Таблица 1 Показание за съвместна диагностика

Тип тумор	Биомаркери	Таргетна терапия
Солидни тумори	NTRK1, NTRK2 и NTRK3 сливане на гени	VITRAKVI® (ларотректиниб)

Обобщение и обяснение на анализа

Клинично описание

Ракът е една от водещите причини за смърт в света и има способността да се зароди във всяка тъкан.^{1, 2} Анализът на генетичната база на рака е важен за идентифициране на пациенти, които биха могли да се повлияят положително от целеви терапии, както и за разработване на нови методи за лечение. Множество гени участват в причиняването на ракови заболявания или тяхната прогресия и много ракове носят разнообразие от варианти, засягащи тези гени и техните функции. Тези варианти може да включват генни мутации, като еднонуклеотидни варианти (SNV), многонуклеотидни варианти (MNV), инсерции или делеции, генни амплификации, генни сливания и сплайс варианти. Друга последица от

мутациите на раковия ген е появата на неоантигени, които предизвикват специфични за рака реакции на имунната система. Мутиралата форма на рака може да бъде изразена чрез TMB и MSI, които са геномни подписи, свързани с геномна нестабилност и проява на ракови неоантигени.

TruSight Oncology Comprehensive е качествен тест за секвениране от следващо поколение (NGS) за изчерпателно геномно профилиране (CGP), който широкоспектърно оценява геномните варианти в голям панел от свързани с рак гени, изброени в Таблица 2. Анализът открива малки варианти в 517 гена, плюс генни амплификации, сливания и сплайс варианти, както е посочено в Таблица 2. Анализът осигурява покритие на кодираща секвенция за всички гени с изключение на TERT, където е покрит само промоторният регион, и оценява TMB резултата и MSI статуса. Тези цели на анализа включват съдържание, цитирано от професионални организации и други основни насоки на САЩ. Независимите публикации на консорциуми и фармацевтичните изследвания в късен етап също оказват влияние върху дизайна на анализа на TSO Comprehensive.

За списък на региони, които не са включени в обозначаването на варианти, вижте *TruSight Oncology Comprehensive Block List* (документ № 200009524), наличен от Illumina [сайта за поддръжка](#).

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

Таблица 2 TSO Comprehensive (EU) Панел за анализ на гени

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
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

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	He e приложено	He e приложено	He e приложено	He e приложено
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	He e приложено	He e приложено	He e приложено	He e приложено
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	He e приложено	He e приложено	He e приложено	He e приложено
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	He e приложено	He e приложено	He e приложено	He e приложено
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	He e приложено	He e приложено	He e приложено	He e приложено

№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант	№	Въведете ИД	Ген	Тип вариант
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо

Принципи на процедурата

Анализът TSO Comprehensive (EU) е разпределен тест, който се извършва ръчно с помощта на извлечена нуклеинова киселина като входен материал. ДНК и/или РНК, извлечена от фиксирана във формалин, включена в парафин (FFPE) тъкан, се използва за изготвяне на библиотеки, които след това се обогатяват за-гени, свързани с тумори и се секвенират на инструмента Инструмент NextSeq 550Dx.

Анализът TSO Comprehensive (EU) включва следните процеси.

- Приготвяне и обогатяване на библиотеки** – за РНК, 40 ng общо се превръща в двойноверижна допълнителна ДНК (cDNA). За геномна ДНК (gDNA), 40 ng gDNA се срязва на малки фрагменти. Универсалните адаптери за секвениране се лигират върху фрагментите на cDNA и gDNA. Във всяка библиотека се включват секвенции на адаптер P5 и P7, за да се даде възможност за улавяне на библиотечните фрагменти върху повърхността на поточната клетка по време на секвенирането. Адаптерите включват индексни секвенции i5 и i7 за идентифициране на всяка отделна проба, а в случай на библиотеки от gDNA проби – на отделни молекули с помощта на уникални молекулярни идентификатори (UMI, Unique Molecular Identifiers). След това библиотеките се обогатяват за специфичните гени, които представляват интерес, като се използва метод на улавяне. Към библиотеките се хибридизират биотинилирани секвенции на сонди, които обхващат регионите на гените, представляващи интерес и цел на анализа. Сондите и хибридираните целеви библиотеки се изолират от нецелевите библиотеки чрез улавяне със стрептавидинови магнитни частици. Обогатените целеви библиотеки се промиват и амплифицират. След това количеството на всяка обогатена библиотека се нормализира, като се използва метод въз основа на топчета, за да се осигури еднакво представяне в обединените библиотеки за секвениране.
- Секвениране и първичен анализ** – нормализираните, обогатени библиотеки се обединяват и групират върху поточна клетка, след което се секвенират, като се използва химичен метод за секвениране чрез синтез (SBS, sequencing by synthesis) на NextSeq 550Dx. SBS химията използва метод с обратим терминатор за откриване на единични, белязани флуоресцентно бази с дезоксинуклеотид трифосфат (dNTP), тъй като те са включени в нарастващи ДНК вериги. По време на всеки цикъл на секвениране към веригата от нуклеинови киселини се добавя единичен dNTP. dNTP маркерът служи като терминатор на полимеризацията. След всяко инкорпориране на dNTP се създава образ на флуоресцентното багрило, за да се идентифицира базата, след което се отстранява, за да се позволи инкорпориране в следващия нуклеотид. Четирите dNTP, свързани с обратими терминатори (A, G, T и C), представляват единични, отделни молекули. В резултат на това естествената конкуренция свежда до минимум едностранчивостта на инкорпорирането. По време на

първичния анализ обозначаваанията на бази се извършват директно от измерванията на интензитета на сигнала по време на всеки цикъл на секвениране, в резултат на което се секвенира база-по-база. Резултат за качеството се задава на всяко обозначаване на база.

- **Вторичен анализ** – Модулът Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager се намира в инструмента NextSeq 550Dx като част от софтуера Local Run Manager, за да се улесни настройката за изпълняване на TSO Comprehensive (EU) и да се извърши вторичен анализ на резултатите от секвенирането. Вторичният анализ включва валидиране на изпълняването и контрол на качеството, последван от демултиплексиране, генериране на FASTQ файлове, подравняване и обозначаване на варианти. Демултиплексирането разделя данните в обединени библиотеки въз основа на уникалните индекси за секвениране, които са добавени по време на процедурата по приготвяне на библиотеките. Създават се междинни файлове FASTQ, които съдържат разчитания на секвенции за всяка проба и резултати за качеството, с изключение на разчитания от клъстери, които не са преминали през филтъра. След това разчитанията на секвенции се подравняват спрямо референтен геном, за да се идентифицира връзката между секвенциите, и им се задава резултат въз основа на регионите със сходство. Подравнените разчитания се записват във файлове във формат BAM. Софтуерът за анализ използва отделни алгоритми за библиотеки, генерирани от ДНК и/или РНК проби, за да обозначи малки варианти на DNA, генни амплификации, TMB и MSI за ДНК проби, както и сливания и сплайс варианти за РНК проби. Софтуерният модул за анализ генерира множество изходни данни, включително показатели за секвениране и файлове с формат на обозначаване на варианта (VCF, Variant Call Format). Файловете VCF съдържат информация относно варианти, открити на конкретни позиции в референтен геном. За всяка проба се генерират показатели за секвениране и индивидуални изходни файлове. Вижте *Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661)* за подробни данни относно вторичния и третичния анализ.
- **Третичен анализ** – Третичният анализ, изпълняван от Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager, се състои от изчисления на TMB и MSI, обозначаване на съвместна диагностика, профилиране на туморни варианти в две нива на клинична значимост, като се използва база знания (БЗ) и типът тъкан, и генериране на отчет за резултатите. Профилирането на тумора още се нарича цялостно геномно профилиране. Резултатите от интерпретираните варианти и резултатите от биомаркерите TMB и MSI, се обобщават в отчета за резултатите от TSO Comprehensive (EU).

Ограничения на процедурата

Само за *инвитро* диагностична употреба.

- Само по предписание. Тестът трябва да се прилага в съответствие с правилата на клиничната лаборатория.
- Геномните находки, изброени в [Таблица 2](#) на раздел Предназначение, не са предписателни или решаващи за посочената на етикета употреба на всеки конкретен терапевтичен продукт.

- За вариантите, изброени в TSO Comprehensive (EU) отчета за резултатите от Genomic Findings (Геномни находки) в раздела Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance (Геномни находки с доказателство за клинично значение) (Ниво 2) и Genomic Findings with Potential Clinical Significance (Геномни находки с потенциално клинично значение) (Ниво 3), не е извършено клинично валидиране.
- Решенията относно грижите за пациента и лечението му трябва да се основават на независимата медицинска преценка на лекуващия лекар, като се вземе предвид цялата приложима информация относно състоянието на пациента, като анамнеза на пациента, фамилна анамнеза, физикални изследвания, информация от други диагностични тестове и предпочитания на пациента, съгласно стандарта за грижи в съответната общност.
- Качеството на FFPE пробите е много променливо. Проби, които не са преминали през стандартни процедури за фиксиране, може да не генерират извлечени нуклеинови киселини, които да отговарят на изискванията за контрол на качеството на анализа ([Качествен контрол на страница 85](#)). FFPE блоковете, които са съхранявани в продължение на повече от пет години, показват по-ниска валидност.
- Не е оценена ефективността на TSO Comprehensive (EU) в проби, получени от пациенти, на които е извършена трансплантация на органи или тъкани.
- Голямо количество некротична тъкан ($\geq 23\%$) може да попречи на способността на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на генни амплификации и сливания на RNA.
- Откриването по соматично задвижени мутации може да не бъде надеждно, ако съдържанието на тумора (по площ) е по-малко от 20%.
- Резултатът от стабилността на микросателита (MS-стабилен) може да бъде ненадежден, ако съдържанието на тумора е по-малко от 30%. Резултатът от високо съдържание микросателит (MSI-High) е правилен, независимо от съдържанието на тумора.
- Хемоглобинът, свързан с тъканта, намалява поддържащите разчитания за сплайс вариантите на MET.
- При силно пренаредени геноми с делеции и загуба на хетерозиготност софтуерът TSO Comprehensive (EU) може погрешно да класифицира ДНК проба като замърсена (CONTAMINATION_SCORE > 3106 и p-стойност > 0,049).
- Получаването на отрицателен резултат не изключва наличието на мутация под границите на откриване (LoD) на анализа.
- Чувствителността за откриване на малки варианти на ДНК може да бъде повлияна от:
 - Геномен контекст с ниска сложност.
 - Нарастваща дължина на варианта.
- Оценките на ТМВ могат да бъдат неточни в следните случаи:
 - Когато съдържанието на тумор стигне нива, в които честотите на вариантите алели (VAF) от герминативната линия и на соматичните вариантни алели се приближават.
 - При популации, които не са добре представени в публичните бази данни.

- Генните амплификации са единствените варианти на броя на копията, отчетени от TSO Comprehensive (EU). Генните делеции не се отчитат от анализа.
- Алгоритмите за обозначаване на сливане в софтуера на анализа TSO Comprehensive (EU) може да не вземат предвид доказателства от разчитания, които се простират извън границите на аотираните гени.
- Чувствителността за откриване на сливания може да бъде повлияна в следните случаи:
 - При ниска сложност на библиотеката, което води до намаляване на поддържащите разчитания поради отклонения в работния процес на анализа (например следвайте стъпките за смесване в [Денатуриране и отгряване на RNA на страница 45](#)).
 - Когато един ген обхваща и двете точки на прекъсване.
 - В случаите, когато няколко точки на прекъсване на сливането са в непосредствена близост една до друга с един или няколко партньора, множеството точки на прекъсване и партньори могат да бъдат отчетени като една точка на прекъсване и един партньор.
 - С малки медианни размери на въвеждане. Изисква се минимален медианен размер на въвеждане от 80 bp, но чувствителността намалява в диапазона 80 – 100 bp.
 - При ниска сложност на секвенцията или хомоложен геномен контекст около точките на сливане.
- Разпознаването на гените, участващи в сливането, може да бъде повлияно, когато точките на сливане са в геномни региони, съдържащи припокриващи се гени. Анализът ще отчете всички гени, изписани разделно с точка и запетая, ако няколко гена се припокриват в точката на прекъсване.
- Покритие без съответствие в региона на промотора на TERT може да доведе до No Result (липса на резултат) поради ниска дълбочина.
- Грешки в аотацията или БЗ могат да доведат до фалшиво положителен или фалшиво отрицателен резултат, включително да се изпише вариант в грешно ниво (между Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance [Геномни находки с доказателство за клинична значимост] (Ниво 2) и Genomic Findings with Potential Clinical Significance [Геномни находки с потенциална клинична значимост] (Ниво 3), или информацията за аотацията в отчета да е неправилна. Вариантите, отчетени в резултатите от CDx, не се влияят от аотации или грешки в БЗ. Възможно е грешката да възникне от следните три източника:
 - Аотация на вариант TSO Comprehensive (EU). Въз основа на анализ на 2 448 350 варианта от COSMIC v92 процентът на грешките е приблизително 0,0027%, следователно вероятността за грешка е малка.
 - Грешка в БЗ, дължаща се на процеса на куриране.
 - Уместността на съдържанието на БЗ се променя с течение на времето. Отчетът отразява знанията по времето, когато версията на БЗ е била курирана.
- TSO Comprehensive (EU) е създаден за отчитане на соматични варианти, когато се отчитат варианти с доказателство за клинично значение или варианти с потенциално клинично значение. Като тест

само за тумор, отчитането на варианти на герминативни (наследени) линии е възможно, но неволно. TSO Comprehensive (EU) използва БЗ за отчитане на варианти, без изрично да се посочва дали са от герминативен или соматичен произход.

- БЗ включва терапевтични, диагностични и прогнозни асоциации, които са относими към варианти, налични в установена солидна злокачествена неоплазма. Асоциациите за предразположеност към или риск от рак не са включени в БЗ.
- Следващата таблица показва нуклеотидните промени за три RET варианта, които анализът не може да открие. Могат да бъдат открити и други нуклеотидни промени за промяната на същата аминокиселина.

Таблица 3 Нуклеотидни промени за три RET варианта

Промяна в аминокиселина	Chr*	Позиция	Reference Allele (Референтен алел)	Алтернатива
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG
				TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA
				CAAAGAGA
				CAAAAAGG
				CCAAGG
				CTAAGAGG

* Chr = Хромозома

Компоненти на продукта

Тестът TSO Comprehensive (EU) се състои от следните компоненти:

- Комплект TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illuminakаталожен № 20063092)—Комплектът включва реагенти с достатъчен обем за генериране на 24 библиотеки за ДНК и 24 за РНК. Този обем включва проби от пациенти и контроли. Контролите се продават отделно (вижте [Необходими реагенти, които не са предоставени на страница 17](#)).
- Познавателна база: Актуализира се редовно и е на разположение за изтегляне от портала Illumina Lighthouse.
- Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (Illuminakаталожен No 20051843), който включва следните компоненти:
 - TSO Comprehensive Пакети с исокове
 - TSO Comprehensive Софтуерен пакет

- TSO Comprehensive USB комплект

Illumina Сервизен представител на инсталира подходящата версия на Local Run Manager върху Модул за анализ TSO Comprehensive (EU) Инструмент NextSeq 550Dx. За информация за аналитичния модул, вижте Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661).

Реагенти

Предоставени реагенти

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

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, част № 20031127

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

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

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ T4 DNA полимераза и полинуклеотид киназа	-25°C до -15°C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли и нуклеотиди	-25°C до -15°C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	-25°C до -15°C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ лигаза	-25°C до -15°C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ универсални секвениращи олигонуклеотиди	-25°C до -15°C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ универсални секвениращи олигонуклеотиди	-25°C до -15°C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	-25°C до -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Буфериран воден разтвор, съдържаща DNA полимераза и нуклеотиди	-25°C до -15°C

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

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

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, част № 20031120

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

**ВНИМАНИЕ**

Използвайте уникални индексни праймери (Unique Index Primers, UPxx) за проби от RNA или DNA. Не комбинирайте индексни праймери CPxx и UPxx в една и съща библиотека.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, част № 20031126

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

**ВНИМАНИЕ**

Използвайте Combinatorial Index Primers (CPxx) само за проби от ДНК. Не комбинирайте индексни праймери CPxx и UPxx в една и съща библиотека.

Индексен праймер	Номер на част	Количество	Обем	Индекс i7	Секвениране	Индекс i5	Секвениране	Температура на съхранение
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25°C до -15°C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25°C до -15°C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25°C до -15°C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25°C до -15°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), част № 20031123

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ формамид и соли	2°C до 8°C

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли и твърдофазни парамагнитни топчета, ковалентно покрити със стрептавидин	2°C до 8°C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Разтвор на натриев хидроксид	2°C до 8°C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Буфериран воден разтвор	2°C до 8°C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ твърдофазни парамагнитни топчета	2°C до 8°C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли. 2-Меркаптоетанол и формаמיד	2°C до 8°C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	2°C до 8°C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	2°C до 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Воден разтвор, съдържащ магнитни топчета	2°C до 8°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), част № 20031121

Реагент	Номер на част	Количество	Обем	Активни съставки	Температура на съхранение
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Буфериран воден разтвор, съдържащ олигонуклеотиди	-25°C до -15°C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Буфериран воден разтвор, съдържащ соли	-25°C до -15°C

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

TruSight Oncology Comp Content Set, част № 20031122

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

Необходими реагенти, които не са предоставени

Предамплификационни реагенти

- DNA and RNA extraction and purification reagents – Вижте [Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28](#) за изискванията към реагентите.
- DNA and RNA quantification reagents – Вижте [Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28](#) за изискванията към реагентите.
- TruSight Oncology Контроли:
 - TruSight Oncology ДНК контрола (Illumina каталожен № 20065041)

- TruSight Oncology PHK контрола (Illumina каталожен № 20065042)
- Етанол (EtOH), 100% (200 proof), молекулярно-биологичен клас
- RNase/DNase-free water

Следамплификационни реагенти

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

Съхранение и обработка на реагенти

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

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



ВНИМАНИЕ

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

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

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



ВНИМАНИЕ

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

- Промените във физическия вид на реагентите могат да показват влошаване на качеството на материалите. Ако настъпят промени във физическия вид (напр. промени в цвета на реагента или помътняване), не използвайте реагентите.
- FSM, SSM, ERA1-B и TCB1 могат да имат частици, свързани с продукта. Следвайте специфичните указания за работа за всеки реагент. След извършване на стъпките за смесване на FSM и SSM, останалите бели частици, свързани с продукта, няма да повлияят на ефективността.
- Стабилността на анализа TSO Comprehensive (EU) е оценена и е демонстрирана ефективност за до четири употреби на комплекта. Реагентите са стабилни, когато се съхраняват при посочените температури до посочения срок на годност върху етикета на кутията.

Оборудване и материали

Необходимо оборудване и материали, не са предоставени

Предамплификационно Оборудване и материали

Оборудване	Доставчик
Ултразвуков апарат със свързани аксесоари Вижте Настройки за конфигуриране на ултразвуков апарат за фрагментация на ДНК на страница 23.	Общ лабораторен доставчик

Оборудване	Доставчик
<p>Термоциклер със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Нагревателен капак, който може да се настрои на 30°C и 100°C (или да се изключи, ако няма възможност за 30°C) • Обхваща температурен диапазон от 4°C до 99°C • ±0,25°C температурна точност • Съвместим с 96-ямкови PCR плаки, 0,2 ml • Вижте Скорост на изменение на термоциклера на страница 25 	Общ лабораторен доставчик
Завихрящ миксер	Общ лабораторен доставчик
Инкубатори за микропроби (2) с вложки за 96-ямкови MIDI плаки (2)	Общ лабораторен доставчик
Микроцентрофуга	Общ лабораторен доставчик
<p>Центрофуга за плаки със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Съвместима с 96-ямкови микроплаки • Възможност за 280 × g (+/- 10%) 	Общ лабораторен доставчик
<p>Съд за разбъркване за плаки със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm орбита • Може да разбърква при 1200 об./мин и 1800 об./мин 	Общ лабораторен доставчик
Уплътнителен клин или валяк	Общ лабораторен доставчик
<p>Магнитна стойка със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Проектирана за утаяване/отделяне на парамагнитни топчета • Магнити отстрани на стойката (а не отдолу) • Съвместим с 96-ямкови MIDI плаки 	Общ лабораторен доставчик
<p>Прецизни пипети, способни да доставят точно обеми между 2 µl до 1000 µl със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Едноканална или многоканална пипета с нарастване от 0,02 µl • Едноканална или многоканална пипета с нарастване от 0,1 µl, 0,2 µl или 0,5 µl • Едноканална или многоканална пипета с нарастване от 1 µl или 2 µl <p>Пипетите трябва да се калибрират редовно и точно в рамките на 5% от посочения обем.</p>	Общ лабораторен доставчик
Помощ за пипета	Общ лабораторен доставчик
Ледено или студено блокче	Общ лабораторен доставчик
Серологични пипети от 10 ml	Общ лабораторен доставчик

Оборудване	Доставчик
Залепващи уплътнения за 96-ямкови плаки със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> Отлепващи се Подходящи за закрити или полузакрити PCR плаки Силно лепило, което издържа многократни температурни промени от -20°C до 100°C Без DNase/RNase 	Общ лабораторен доставчик
Епруветки за микроцентрифугиране с капацитет 1,7 ml, без нуклеаза	Общ лабораторен доставчик
Резервоари за реактиви без нуклеаза (PVC, ваничка за еднократна употреба, 50 ml) (или еквивалент)	Общ лабораторен доставчик
Конусовидни епруветки 15 ml	Общ лабораторен доставчик
Конусовидни епруветки 50 ml	Общ лабораторен доставчик
Съвместими накрайници за пипети с устойчивост на аерозоли	Общ лабораторен доставчик
96-ямкови плаки за съхранение, 0,8 ml (MIDI плаки)	Fisher Scientific, част № АВ-0859 или еквивалентна
96-ямкови PCR плаки, съвместими с термоциклер, 0,2 ml (полипропиленови ямки)	Общ лабораторен доставчик

Следамплификационно оборудване и материали

Оборудване	Доставчик
Инструмент NextSeq 550Dx	Illumina, каталожен № 20005715
Центрофуга за плаки със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> Съвместима с 96-ямкови микроплаки Възможност за 280 × g (+/- 10%) 	Общ лабораторен доставчик
Термоциклер със следните спецификации: <ul style="list-style-type: none"> Нагревателен капак (100°C) Обхваща температурен диапазон от 4°C до 99°C ±0,25°C температурна точност Съвместим с 96-ямкови PCR плаки, 0,2 ml Вижте Скорост на изменение на термоциклера на страница 25 	Общ лабораторен доставчик
Завихрящ миксер	Общ лабораторен доставчик
Инкубатор за микропроби с вложка за 96-ямкови MIDI плаки	Общ лабораторен доставчик

Оборудване	Доставчик
<p>Сух топлинен блок със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Температурен диапазон от 25°C до 99°C • ±5°C температурна точност • Уверете се, че епруветките за микроцентрифугиране са съвместими с топлинния блок 	Общ лабораторен доставчик
<p>Съд за разбъркване за плаки със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm орбита • Може да разбърква при 1200 об./мин и 1800 об./мин 	Общ лабораторен доставчик
Микроцентрифуга	Общ лабораторен доставчик
Уплътнителен клин или валяк	Общ лабораторен доставчик
<p>Магнитна стойка със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Проектирана за утаяване/отделяне на парамагнитни топчета • Магнити отстрани на стойката (а не отдолу) • Съвместим с 96-ямкови MIDI плаки 	Общ лабораторен доставчик
<p>Прецизни пипети, способни да доставят точно обеми между 2 µl до 1000 µl със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Едноканална или многоканална пипета с нарастване от 0,02 µl • Едноканална или многоканална пипета с нарастване от 0,1 µl, 0,2 µl или 0,5 µl • Едноканална или многоканална пипета с нарастване от 1 µl или 2 µl <p>Пипетите трябва да се калибрират редовно и точно в рамките на 5% от посочения обем.</p>	Общ лабораторен доставчик
Помощ за пипета	Общ лабораторен доставчик
Серологични пипети от 10 ml	Общ лабораторен доставчик
<p>Залепващи уплътнения за 96-ямкови плаки със следните спецификации:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Отлепващи се • Подходящи за закрити или полузакрити PCR плаки • Силно лепило, което издържа многократни температурни промени от -20°C до 100°C • Без DNase/RNase 	Общ лабораторен доставчик
Епруветки за микроцентрифугиране с капацитет 2 ml, без нуклеаза	Общ лабораторен доставчик
Епруветки за микроцентрифугиране с капацитет 1,7 ml, без нуклеаза	Общ лабораторен доставчик
Резервоари за реактиви без нуклеаза (ваничка за еднократна употреба, 50 ml) (или еквивалент)	Общ лабораторен доставчик
Конусовидни епруветки 15 ml	Общ лабораторен доставчик

Оборудване	Доставчик
Конусовидни епруветки 50 ml	Общ лабораторен доставчик
Съвместими крайници за пипети с устойчивост на аерозоли	Общ лабораторен доставчик
96-ямкови плаки за съхранение, 0,8 ml (MIDI плаки)	Fisher Scientific, част № АВ-0859 или еквивалентна
96-ямкови PCR плаки, съвместими с термоциклер, 0,2 ml (полипропиленови ямки)	Общ лабораторен доставчик
Ледено или студено блокче	Общ лабораторен доставчик

Настройки за конфигуриране на ултразвуков апарат за фрагментация на ДНК

DNA фрагментацията, или срязването, влияе на ефективността на анализа, като определя разпределението на размера на фрагмента, което от своя страна влияе върху покритието на секвенирането. Няколко конфигурации за фокусирана ултразвукова обработка бяха оценени и оптимизирани за TSO Comprehensive (EU) анализа ([Таблица 4](#)).

- Времето за срязване беше коригирано, за да се увеличи максимално показателят MEDIAN_EXON_COVERAGE, очертан в [Качествен контрол на страница 85](#). Времената на срязване (вижте [Таблица 4](#)) и резултатите от MEDIAN_INSERT_SIZE се различаваха в различните конфигурации.
- Конфигурации 1–4 и 6 са тествани с 8-лентови стъклени епруветки. Конфигурация 5 използва единична стъклена епруветка. Обемните капацитети на епруветката са показани в [Таблица 4](#).
- Оптимизация на конфигурации 3–6 (по-малки обеми на водна баня) използва пулсиране.
- Конфигурации 3–5 се срязват в епруветки с по-малък обем. Обемните капацитети на епруветката влияят върху параметрите на срязване.
- Конфигурация 4 (линеен трансдюсер, среден обем на водна баня, дегазирана вода) изисква дълго време на забавяне на импулса (40 секунди), за да се постигне подобно MEDIAN_EXON_COVERAGE като конфигурация 1 и 2 при номинален вход от 40 ng.
- Оптималните настройки за конфигурация 3 доведоха до малко по-голямо разпределение на размера на фрагмента в сравнение с другите конфигурации (MEDIAN_INSERT_SIZE е приблизително с 5–10 базови двойки по-голяма).
- Конфигурации 3 и 5 използват негазирана вода и най-малкия обем водна баня.
- Конфигурации 3 и 5 се нуждаят от увеличен DNA вход (50 ng за конфигурация 3, 60 ng за конфигурация 5), за да постигнат сходен MEDIAN_EXON_COVERAGE спрямо другите 4 конфигурации, които използваха номиналния вход от 40 ng.
- Конфигурации 3 и 5 имат повече повреди и/или денатурация и следователно намалена ефективна маса на използваемите dsDNA молекули за приготвяне на библиотеката.

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

Таблица 4 Оценени конфигурации на фокусиран ултразвуков апарат

Параметър	Конфигурация					
	1	2	3	4	5	6
Трансдюсер	Линия	Точка	Точка	Линия	Точка	Линия
Обем на водна баня	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Дегазирана вода	Да	Да	Не	Да	Не	Да
Охладител за вода	Да	Да	Да	Да	Да	Да
Температура на водна баня	7°C	7°C	12°C	12°C	20°C	10°C
Пикова мощност на инцидента (PIR)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% фактор на избухване	30	10	30	25	20	25
Цикли на избухване	200	200	1000	1000	1000	600
Пулсиране (избухвания от 10 секунди)	Не	Не	Да	Да	Да	Да
Време на забавяне на пулсирането	Не е приложимо	Не е приложимо	10 сек	40 сек	10 сек	10 сек
Време за рязане	250 сек	280 сек	200 сек ¹	320 сек ²	200 сек ¹	320 сек ²
Обработка на проби	1 – 8	1	1	1 – 8	1	1 – 8
Размер на партидата	1 – 96	1 – 96	1 – 8	1 – 8	1	1 – 96
Размер на пробата от стъклена 8-лентова епруветка	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Единична епруветка (50 µl)	130 µl (или 96 microTUBE плака)
Дитеринг	Не е приложимо	Не е приложимо	Не е приложимо	3 mm Y @ 20 mm/s	Не е приложимо	1,5 mm Y @ 10 mm/s
Еквивалент на вход на DNA (за средно покритие на екзон)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ Времето за рязане от 200 секунди се състои от избухвания от по 10 секунди с 20 повторения.

² Времето за рязане от 320 секунди се състои от избухвания от по 10 секунди с 32 повторения.

Скорост на изменение на термоциклера

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

Събиране, транспортиране и съхранение на спесимени

Следвайте стандартните процедури при събиране, транспортиране, съхранение и обработка на пробите.

Изисквания за пробите

FFPE тъкан

Анализът TSO Comprehensive (EU) изисква 40 ng РНК и/или 40 ng ДНК, извлечени от FFPE тъкан. Използването на РНК и ДНК позволява анализ на всички искани типове варианти. Тъканта трябва да се фиксира с помощта на формалинов фиксатор, подходящ за молекулярни анализи (например 10% неутрален буфериран формалин). Тъканта не трябва да се декалцифицира. Преди да извършите анализа TSO Comprehensive (EU), тъканната проба трябва да бъде изследвана от патолог, за да се гарантира, че е подходяща за този тест. За откриване на соматични мутации е необходимо минимум 20% туморно съдържание (по площ). Надеждното откриване на MSI статус в различни проби изисква минимум 30% туморно съдържание. Ако пробата е тествана с по-малко от 30% туморно съдържание, за да се определят резултатите с други видове варианти, резултатът от MS-Stable може да не е надежден. Резултатът от MSI-High е правилен, независимо от туморното съдържание.

Туморното съдържание за генни амплификации и варианти на RNA зависи от степента на амплификация или експресия на сливане (вижте [Туморно съдържание на страница 109](#)).

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

Големи количества некротична тъкан ($\geq 23\%$ по зона) може да попречи на способността на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на генни амплификации и сливания на РНК. Ако участъците от пробата съдържат повече от 23% некроза в общата площ на тъканта, тогава некротичната тъкан трябва да бъде макродисектирана. Ако лабораторията извършва РНК с анализа, тъкан с хемоглобин трябва да се избягва или минимизира при получаване на срезове от тъканния блок. Вижте [Смуцаващи процеса вещества на страница 100](#).

FFPE тъкан на предметни стъкла може да се съхранява до 28 дни при стайна температура.

Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение

- Извлечете РНК и ДНК от FFPE тъканните проби с помощта на наличните в търговската мрежа комплекти за извличане. Разликите в комплектите за извличане може да окажат влияние върху изпълнението. Вижте [Оценка на комплект за извличане на нуклеинова киселина на страница 98](#).
- Не увеличавайте протеиназа К или еквивалентен ензим по време на екстрахиране от стандартната концентрация, предоставена в комплект за екстрахиране. Вижте [Смуцаващи процеса вещества на страница 100](#).
- Съхранявайте извлечената налична нуклеинова киселина, като спазвате инструкциите от производителя на комплектите за извличане.
- Да се съхранява извлечената DNA до 28 дни при -25°C до -15°C.
- Да се съхранява извлечената RNA до 28 дни при -85°C до -65°C.
- За да избегнете промени в концентрацията с течение на времето, измерете DNA и RNA в рамките на 28 дни, преди да започнете приготвянето на библиотеките. Определете количествено RNA и DNA с помощта на флуорометричен метод за количествено определяне, който използва багрила, свързващи нуклеиновата киселина. Концентрацията на нуклеинова киселина трябва да бъде средната стойност от поне три измервания.
- Анализът изисква 40 ng от всяка RNA проба, приготвени във вода без RNase/DNase- (не е предоставена), с краен обем от 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Анализът изисква 40 ng от всяка gDNA проба с минимална концентрация на екстракция от 3,33 ng/µl. Срязването изисква краен обем от 52 µl (0,77 ng/µl) с минимум 40 µl ТЕВ (предоставен), използван като разреждател.

Съхранение на библиотеки

Съхранявайте библиотеки в PCR плаки с ниско свързване за 7 до 32 дни, в зависимост от типа библиотека (вижте [Таблица 5](#)).

Таблица 5 Време за съхранение на библиотеки

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

Тип библиотека	Плака	Брой дни	Температура на съхранение
След обогатяване	ELU2 PCR	≤ 7	-25°C до -15°C
PCR след обогатяване	PL PCR	≤ 30	-25°C до -15°C
Нормализиран	NL PCR	≤ 32	-25°C до -15°C

Предупреждения и предпазни мерки

Безопасност



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Този набор от реактиви съдържа потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Вентилацията трябва да е подходяща за работа с опасни материали в реактивите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реактиви като химичен отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За допълнителна информация относно околната среда, здравето и безопасността, вижте SDS на адрес support.illumina.com/sds.html.

- Работете с всички спесимени така, сякаш е известно, че са инфекциозни.
- Използвайте обичайните лабораторни предпазни мерки. Не пипетирайте с уста. Не яжте, не пийте и не пушете в определените работни зони. Носете ръкавици за еднократна употреба и лабораторни престилки при работа с проби и реагенти за анализ. Измивайте внимателно ръцете си след работа с проби и реагенти за анализ.

Лаборатория

- За да предотвратите замърсяване, организирате еднопосочен работен поток в лабораторията. Зоните преди и след амплификация трябва да разполагат със специално оборудване и материали (например пипети, накрайници за пипети, завихрящ миксер и центрофуга). За да предотвратите пренасяне на продукт на амплификация или на сонда, избягвайте връщането в зоната преди амплификация, след като влезете в зоната след амплификация.
- Изпълнете стъпките за Индекс на PCR и обогатяване в зона след амплификация, за да предотвратите пренасяне на продукта от амплификация.
- Процедурите за приготвяне на библиотеката изискват среда без RNase/DNase. Старателно отстранете замърсяването от работните зони с RNase/DNase -инхибиращ почистващ препарат. Използвайте сертифицирани пластмаси, които не съдържат DNase, RNase и човешка геномна ДНК.

- За процедури след амплификация почиствайте добре работните повърхности и оборудването преди и след всяка процедура с прясно приготвен 0,5% разтвор на натриев хипохлорит (NaOCl). Оставете разтвора да влезе в контакт с повърхностите за 10 минути и след това избършете добре със 70% етилов или изопропилов алкохол.
- Използвайте епруветки за микроцентрифугиране, плаки, крайници на пипети и резервоари без нуклеаза.
- Използвайте калибрирано оборудване по време на целия анализ. Не забравяйте да калибрирате оборудването за скоростите, температурите и обемите, посочени в този протокол.
- Използвайте прецизни пипети, за да се гарантира прецизното доставяне на реагенти и проби. Калибрирайте редовно според спецификациите на производителя.
- Използвайте следните указания при употребата на многоканални пипети:
 - Пипетирайте минимум $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Уверете се, че крайниците на преградата са добре прилепнали и подходящи за марката и модела на многоканалната пипета.
 - Прикрепете крайниците с въртеливо движение, за да е сигурно, че всички крайници се прикрепят еднакво добре.
 - Аспирирайте под ъгъл от 90° с равни нива на обем на течността във всички крайници.
 - Смесете всички компоненти след доставката, като пипетирате реакционната смес нагоре и надолу.
 - След дозиране се уверете, че течността е напълно отделена от всеки крайник.
- Уверете се, че използвате оборудването, определено за анализа, и задайте програмите според указанията.
- Посочените температури за термоциклера и инкубатора за микропроби показват температурата на реакцията, а не непременно зададената температура на оборудването.

Анализ

- Избягвайте кръстосано замърсяване.
 - Спазвайте правилните лабораторни практики при работа с проби и реагенти.
 - Използвайте нови консумативи за лабораторното оборудване и нови крайници за пипети за отделните проби и дозираня на реагенти.
 - Използвайте устойчиви на аерозоли крайници за намаляване на риска от кръстосано замърсяване.
 - Използвайте едностранен работен поток, когато преминавате от зони преди амплификация към зони след амплификация.

- Работете с един и отваряйте само един индексен праймер в даден момент. Затворете отново всяка индексна епруветка веднага след употреба. В комплекта са предоставени допълнителни капачки.
- Сменяйте ръкавиците често и при контакт с индексни праймери или проби.
- Отстранете неизползваните епруветки с индексен праймер от работната зона.
- Не връщайте реагентите в епруветките за съхранение след употреба с лента с епруветки, ваничка или резервоар.
- Смесете пробите с пипета и центрофугирайте плаката, когато е указано.
- Използвайте уред за разбъркване на микроплаки. Не вортексирайте плаките.
- Не разменяйте компоненти на анализи от различни партии на комплекти с реагенти. Партидите на комплекти с реагенти са идентифицирани на етикета на кутията с комплекти на реагенти и листа на основната партида.
- Необходими са подходящи лабораторни практики, за да се предотврати замърсяването от нуклеазите и продуктите от PCR върху реагенти, апаратура, проби и библиотеки. Замърсяването на нуклеазата и продуктите от PCR може да доведе до неточни и ненадеждни резултати.
- Необходим е подходящ тип плака за оптимално изпълнение на анализа и съхранение. Уверете се, че следват инструкциите за прехвърляне на плаки в [Инструкции за употреба на страница 40](#).
- Неспазването на описаните процедури може да доведе до грешни резултати или до значително влошаване на качеството на библиотеката.
- Освен ако в [Инструкции за употреба на страница 40](#) не е посочена безопасна точка на спиране, продължете незабавно със следващата стъпка.
- Съхранявайте реагентите или компонентите на анализа при указаната температура и в определената преди амплификационна и след амплификационна зона.
- Не съхранявайте реагенти в модул за съхранение без замръзване или в отделения на вратата на хладилника.
- Не замразявайте реагенти, съдържащи топчета (LNB1, SPB и SMB).
- Не използвайте реагенти, които са били съхранявани неправилно.
- Не се отклонявайте от процедурите за смесване и обработка, посочени за всеки реагент. Неподходящото смесване или прекомерното вортексиране на реагентите може да доведе до неуспешни резултати от пробата.
- FSM, SSM, ERA1-B и TCB1 могат да имат частици, свързани с продукта. Следвайте указанията за работа за всеки конкретен реагент. След извършване на стъпки за смесване на FSM и SSM, останалите бели частици, свързани с продукта, няма да повлияят на производителността.
- Пригответе нови основни смеси и изхвърлете останалия обем след употреба.
- Задължително пригответе пресен 80% етанол с вода без RNase/DNase за стъпките за измиване. Етанолът може да абсорбира влага от въздуха, което може да повлияе на резултатите. Изхвърлете 80% етанол след употреба в съответствие с местните, държавни и/или федерални разпоредби.

- Прехвърлете посочения обем елуат. Прехвърлянето на по-малко от посочения обем елуат по време на етапите на елуиране би могло да повлияе на резултатите.
- Използвайте следните указания за ултразвукови апарати. Уверете се, че следват инструкциите на производителя.
 - Поставете gDNA в епруветката на ултразвуковия апарат бавно, за да избегнете образуването на мехурчета. Прекомерните мехурчета или въздушното пространство в епруветката за срязване биха могли да доведат до непълна фрагментация.
 - Разпределете бавно в епруветките на ултразвуковия апарат и избягвайте пръскането.
 - За да избегнете изместване на течността и загуба на пробата, не поставяйте крайника на пипетата в дъното на епруветката на ултразвуковия апарат, когато отстранявате фрагментирана DNA.
- Не пипетирайте по-малко от 2 µl от въведената проба.
- Не използвайте ваничка за дозиране на реагенти за стъпки, които изискват добавяне на по-малко от 10 µl материал към всяка ямка за проба.
- Използвайте пипета с фин връх, когато прехвърляте фрагментирани gDNA проби от епруветките на ултразвуковия апарат към плаката за приготвяне на библиотека (Library Prep, LP).
- Не комбинирайте SUA1 и UMI адаптери.
- Използвайте адаптери SUA1 с РНК проби.
- Използвайте адаптери UMI с ДНК проби.
- Задайте различни индексни праймери за всяка библиотечна проба, за да идентифицирате уникално всяка библиотека, когато е обединена за секвениране в една поточна клетка.
- Не комбинирайте индексни праймери CPxx и UPxx в една и съща библиотека.
- Несъответствията между пробите и индексните праймери причиняват неправилно отчитане на резултатите поради загуба на положителна идентификация на пробата. Въведете идентификатори на пробите и задайте индекси в Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager, преди да започнете да приготвяте библиотеката. Запишете идентификаторите на пробата, индексването и ориентацията на ямката на плаката за справка по време на приготвянето на библиотеката.
- За библиотеки, получени от РНК проби, използвайте само UPxx индекси.
- За библиотеки, получени от ДНК проби, използвайте UPxx индекси или CPxx индекси.
- Секвенирайте максимум 8 РНК библиотеки и 8 ДНК библиотеки на поточна клетка. Секвенирайте най-малко три библиотеки. Следвайте насоките в [Брой библиотеки и подбор на индекси на страница 37](#).
- След стъпката на свързване в [Целево улавяне – първа част на страница 63](#) и [Целево улавяне – втора част на страница 67](#) продължете незабавно към стъпката на измиване, за да предотвратите изсъхване на гранулата.

- По време на стъпките на измиване отстранете всички етанол 80% от дъното на ямките. Доказано е, че остатъчният етанол оказва влияние върху резултатите.
- За оптимална ефективност на анализа следвайте посочения брой измивания, указан в [Инструкции за употреба на страница 40](#).
- По време на процедурата за [Нормализиране на библиотеките на страница 74](#) старателно суспендирайте повторно гранулата от библиотеката, за да постигнете еднородна плътност на клъстерите на поточната клетка.
- Незабавно докладвайте за всички сериозни инциденти, свързани с този продукт, на Illumina и на компетентните органи на държавите членки, в които са се установили потребителят и пациентът.

Процедурни бележки

- Работният процес на TSO Comprehensive (EU) може да се проведе по следния график:
 - Ден 1: Синтез на cDNA от RNA проби, DNA фрагментация на gDNA проби, приготвяне на библиотеките и начало на (първа) хибридизация за следващия ден.
 - Ден 2: Обогаляване, нормализиране на обогатените библиотеки и зареждане на библиотеките в Инструмент NextSeq 550Dx.

Ако не е възможно да се изпълни работният процес на TSO Comprehensive (EU) съгласно този график, в целия протокол са посочени няколко безопасни точки на спиране. Освен ако в протокола не бъде посочена безопасна точка на спиране, продължете незабавно със следващата стъпка.

- Библиотеките, произхождащи от РНК и ДНК проби могат да се приготвят едновременно в различни ямки.
- Таблиците за приготвяне на основната смес включват превишаване на обема, за да се гарантира, че има достатъчно обем за броя на обработваните проби.
- Използвайте вода от молекулярен тип, която не съдържа нуклеази.
- След добавяне на реагент изплакнете крайника, като аспирирате и дозирате еднократно в подходящата ямка в плаката, освен ако не е посочено друго в процедурата.
- Стайната температура се определя като температура между 15°C и 30°C.
- Реагентите, пробите и библиотеките трябва да се държат на студено при определени стъпки в инструкциите за употреба. Това се определя като съхранение върху лед или еквивалент.

Програми на термоциклера

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

Запечатване и разпечатване на плаката

- Винаги запечатвайте плаките с ново залепващо уплътнение. Не използвайте повторно уплътнения.
- За да запечатате плаката, поставете здраво залепващия капак върху плаката с уплътнителен клин или валяк.
- Винаги запечатвайте 96-ямковата плака с ново залепващо уплътнение преди следващите стъпки в протокола.
 - Стъпки за разбъркване на плаката
 - Стъпки на центрофугиране
 - Стъпки на термоциклера
 - Хибридизации
 - Дългосрочно съхранение
- Уверете се, че ръбовете и ямките са запечатани, за да намалите риска от кръстосано замърсяване и изпаряване.
- Поставете плаката върху равна повърхност, преди бавно да отстраните уплътнението.
- Преди разпечатване, ако се наблюдава някаква течност или конденз върху уплътнението или страничните стени на ямките на плаките, центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
- Използвайте залепващи уплътнения, които са ефективни при -20°C до 100°C и са0 подходящи за закрити или полузакрити PCR плаки.

Оборудване

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

Тип плака и прехвърляния на плака

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

Центрофугиране

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

Работа с реагенти

- Затворете плътно всички епруветки с реагент веднага след употреба, за да ограничите изпарението и да предотвратите замърсяване.
- Върнете реагентите до определената температура на съхранение, когато вече не са необходими за процедура.
- Следвайте подготовката на реагента, която предхожда всяка процедура в раздела [Инструкции за употреба на страница 40](#).
- Уверете се, че сте подготвили необходимия обем основна смес, смес за елуиране и 80% етанол за броя на пробите, които обработвате.
- Обемите, предоставени в таблиците за основна смес и разтвори, съдържат остатък. Изчисленията за остатъчния обем са както следва.
 - [Таблица 14](#)
 - Обем на FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{брой проби} + \text{контроли}) \times (1,25)$.
 - Обем на RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{брой проби} + \text{контроли}) \times (1,25)$.
 - [Таблица 21](#)
 - Обем на ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,20)$.
 - Обем на ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,20)$.
 - [Таблица 29](#)
 - Обем на EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,364)$.
 - Обем на HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,364)$.
 - [Таблица 30](#)
 - Обем на EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,364)$.
 - Обем на HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,364)$.
 - [Таблица 36](#)
 - Обем на LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (2,0)$.
 - Обем на LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (2,0)$.
 - [Таблица 37](#)
 - Обем на EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,25)$.
 - Обем на HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{брой библиотеки}) \times (1,25)$.

Комплекти адаптери

- Анализът TSO Comprehensive (EU) включва адаптери SUA1 и UMI.
- Адаптери SUA1 са предназначени за използване с RNA проби. Да не се използва с DNA проби.
- Адаптери UMI са предназначени за използване с DNA проби. Да не се използва с RNA проби.

Боравене с топчета

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

Брой библиотеки и подбор на индекси

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

За TSO Comprehensive (EU) следвайте указанията в [Таблица 6](#) и [Таблица 7](#) за определяне на броя на библиотеките за секвениране на РНК и/или ДНК в една поточна клетка. Вижте [Таблица 6](#), ако секвенирате библиотеки с РНК или ДНК отделно. Вижте [Таблица 7](#), ако секвенирате библиотеки за РНК и ДНК на една и съща поточна клетка.

Таблица 6 Секвениране на библиотеки на РНК или ДНК

Тип библиотека	Минимум*	Максимум*
Само RNA	3	16
Само ДНК	3	8

* NTC не допринасят за сложността.

Таблица 7 Секвениране на библиотеки за РНК и ДНК на една и съща поточна клетка

Тип библиотека	Минимум*	Максимум*
РНК	3	8
ДНК	3	8

* NTC не допринасят за сложността.

За *оптимално използване* на реагенти при секвениране на библиотеки с ДНК TSO Comprehensive (EU) и Инструмент NextSeq 550DxРНК с на, секвенирайте 8 РНК библиотеки и 8 ДНК библиотеки на поточна клетка.

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

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

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

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

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

При секвениране само на три библиотеки важат следните изисквания:

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

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

TruSight Oncology Контроли

TSO Comprehensive (EU) изисква TruSight Oncology Controls, които се състоят от TruSight Oncology ДНК контрола и TruSight Oncology РНК контрола като положителни контроли. Включете TruSight Oncology DNA контрола за всяко изпълняване на секвениране на DNA и TruSight Oncology RNA контрола за всяко изпълняване на секвениране на RNA в рамките на дадено събитие за приготвяне на библиотека (включете и контроли за комбинирано изпълняване на DNA и RNA). Подготвя се уникална положителна контрола за всяко планирано изпълняване на секвениране. За повече информация, вижте Листовка за TruSight Oncology Controls (документ № 200009919).

-Положителното количество на входния контрол е 40 ng за ДНК и РНК.

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

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

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

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

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

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

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

Инструкции за употреба

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

Работен процес за приготвяне на библиотека

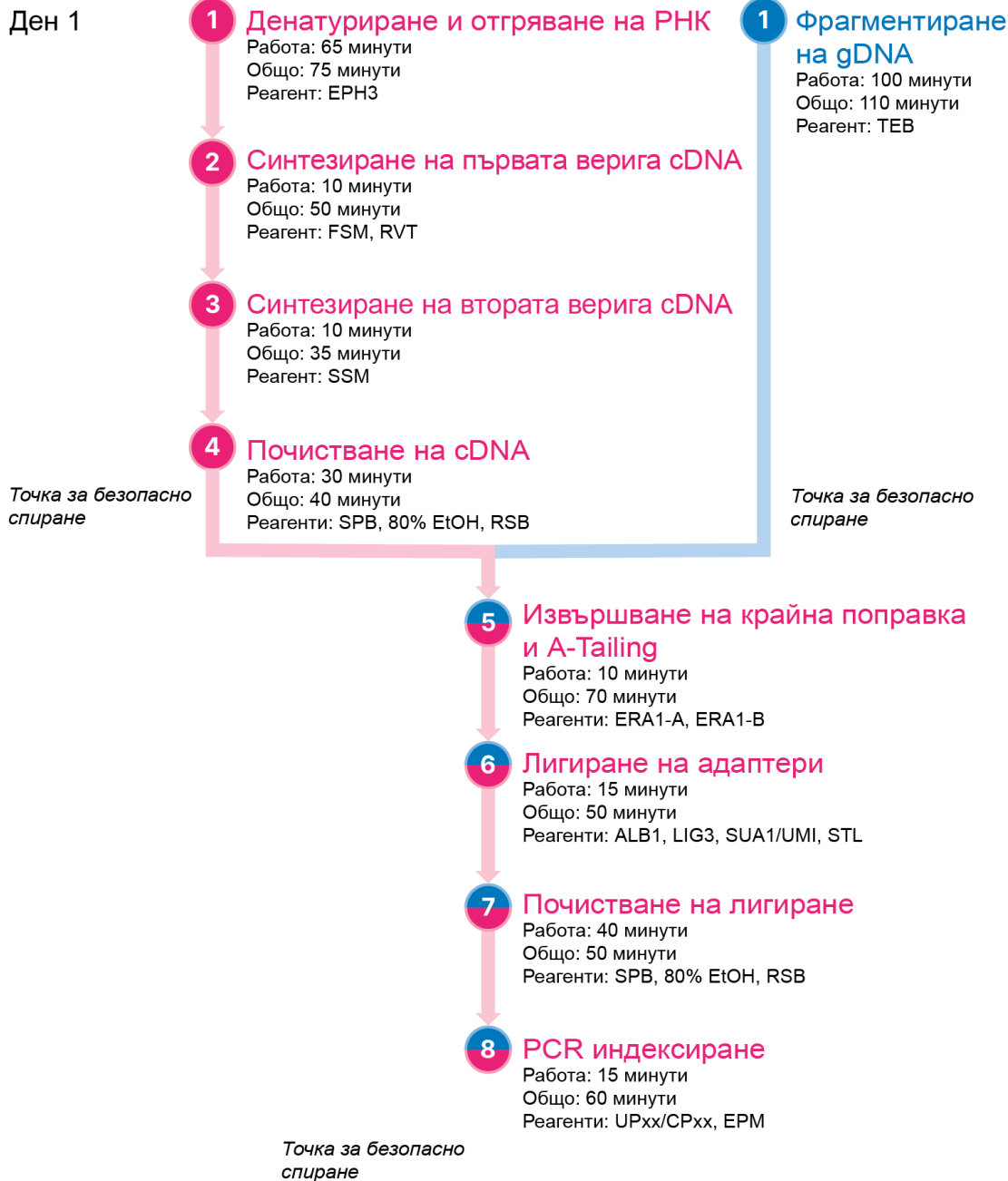
[Фигура 1](#) илюстрира работния процес за приготвяне на библиотека за TSO Comprehensive (EU).

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

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

Преди да започнете протокола, въведете информация за изпълняване и за проба в Модул за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager. Вижте *Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661)*.

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

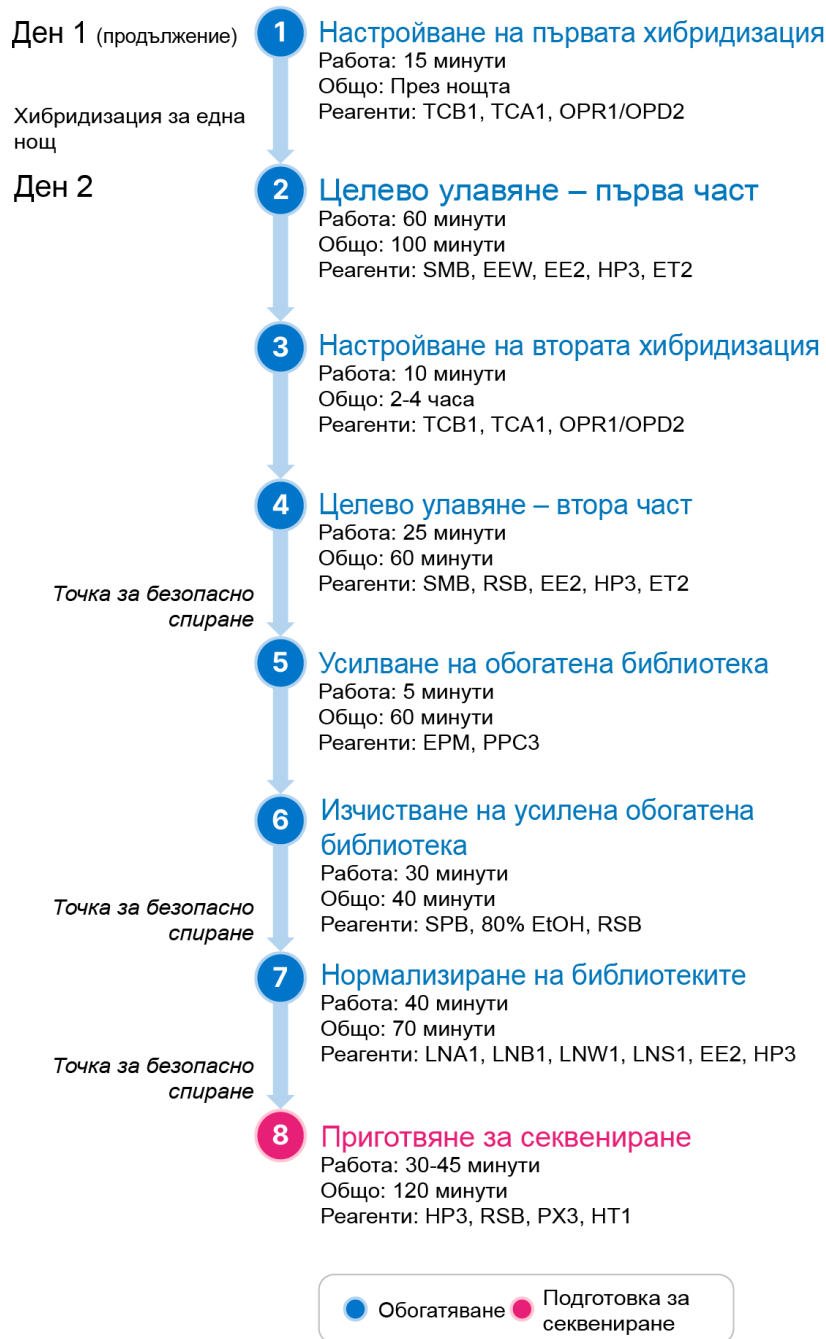


* Работата и общото време са приблизителни.

Работен поток за обогатяване

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

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



Програмни термоциклери

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

Таблица 10 Програми на термоциклери преди амплификация

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

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

Таблица 11 Програми на термоциклери след амплификация

Процедурна стъпка	Име на програмата	Температура на капака	Обем на реакция	Параметри на термоциклер
PCR индексирание	I-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 30 секунди • 15 цикъла от: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C в продължение на 10 секунди • 60°C в продължение на 30 секунди • 72°C в продължение на 30 секунди • 72°C в продължение на 5 минути • Задръжете на 10°C

Процедурна стъпка	Име на програмата	Температура на капака	Обем на реакция	Параметри на термоциклер
Извършване на първа хибридизация	HYB1	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> 95°C в продължение на 10 минути 85°C в продължение на 2 мин 30 секунди 75°C в продължение на 2 мин 30 секунди 65°C в продължение на 2 мин 30 секунди Задържане при 57°C за 8 до 24 часа
Извършване на втора хибридизация	HYB2	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> 95°C в продължение на 10 минути 85°C в продължение на 2 мин 30 секунди 75°C в продължение на 2 мин 30 секунди 65°C в продължение на 2 мин 30 секунди Задържане при 57°C за 1,5 до 4 часа
Усилване на обогатена библиотека	EL-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> 98°C в продължение на 30 сек 18 цикъла от: <ul style="list-style-type: none"> 98°C в продължение на 10 сек 60°C в продължение на 30 сек 72°C в продължение на 30 сек 72°C в продължение на 5 мин Задръжете на 10°C

Подготовка за протокола

Тази подготовка е необходима за изпълнение на стъпките на протокола, водещи до следващата точка за безопасно спиране.



ВНИМАНИЕ

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

1. Старателно отстранете замърсяването от работните зони с почистващ препарат, инхибиращ RNase/DNase.
2. Уверете се, че са зададени програми за термоциклери преди амплификация. Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).
3. Следвайте инструкциите на производителя, за да настроите ултразвуковия апарат.
4. Ако обработвате само DNA проби, преминете директно към [Фрагментиране на gDNA на страница 50](#).
5. Извадете RNA контролите от съхранение.

6. Извадете епруветките с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

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

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

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

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

Денатуриране и отгряване на RNA

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

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.

- EPH3 – Оставете настрана.
- FSM – Вортексирайте, за да се смесят. Центрофугирайте за кратко, после пипетирайте, за да смесите.
Реагентът може да съдържа бели частици, свързани с продукта. Не се изисква действие от страна на потребителя. Няма въздействие върху производителността на продукта.
- RVT – Центрофугирайте за кратко, после пипетирайте, за да се смеси. Дръжте на студено.

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

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

Таблица 14 Основна смес FSM + RVT*

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

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

- Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
- Дръжте основната смес FSM + RVT на студено до [Синтезиране на първата верига cDNA на страница 47](#).

Процедура

- Дръжте екстрахираните RNA проби и RNA контроли на студено, докато се размразяват. Обработете RNA контролите като проби за останалата част от протокола.
- Дръжте RNA на студено, когато не се използва. Вижте [Изисквания за пробите на страница 26](#) за количествено определяне на пробите.
- Пипетирайте всяка RNA проба 10 пъти, за да се смеси.
- Използвайте вода без RNase/DNase, за да пригответе 40 ng от всяка RNA проба в краен обем от 8,5 µl (4,7 ng/µl).
За RNA контроли използвайте концентрацията, предоставена на етикета на епруветката.
- Етикетирайте нова 96-ямкова PCR плака като CF (cDNA фрагменти).
- Добавете 8,5 µl от всяка RNA проба към уникална ямка на CF PCR плаката.
- Уверете се, че оформлението и индексите на пробната плака за всяка проба съвпадат с планираното изпълняване в Модул за анализ TSO Comprehensive (EU) по време на настройката на изпълняването.
- Вортексирайте EPH3, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
- Добавете 8,5 µl EPH3 към всяка ямка за проба.
- Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.



ВНИМАНИЕ

Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.

- Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
- Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
- Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата за LQ-RNA.
Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).
- Когато пробите достигнат 4°C, задръжте за 1 минута. Пристъпете незабавно към следващата стъпка.

Синтезиране на първата верига cDNA

Този процес обратно транскрибира RNA фрагментите, праймирани с произволни хексамери в първата верига cDNA, използвайки reverse transcriptase.

Процедура

1. Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
2. Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси основната смес FSM + RVT. Уверете се, че миксът FSM + RVT е напълно хомогенен.
3. Добавете 8 µl основна смес FSM + RVT към всяка ямка за проба.
4. Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
5. Изхвърлете останалата основна смес FSM + RVT.
6. Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
7. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.
8. Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
9. Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата 1stSS.
Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).
10. Когато пробите достигнат 4°C, преминете незабавно към следващата стъпка.
Пробите от първата верига могат да се държат при 4°C за до 5 минути.

Синтезиране на втората верига cDNA

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

Подготовка

1. Подгответе SSM:
 - a. Обърнете 10 пъти до смесване.
 - b. Центрофугирайте за кратко. Реагентът може да съдържа бели частици, свързани с продукта. Не се изисква действие. Няма въздействие върху производителността на продукта.

Процедура

1. Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
2. Добавете 25 µl SSM към всяка ямка за проба.
3. Добавете залепващо уплътнение към CF PCR плаката.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
4. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 1 минута.

- Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
- Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата 2ndSS.
Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).
- Когато пробите достигнат 4°C, задръжте за 1 минута и преминете незабавно към следващата стъпка.

Почистване на cDNA

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

Подготовка

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

Таблица 15 Приготвяне на пресен EtOH 80%

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

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

Процедура

Свързване

- Отстранете CF PCR плаката от термоциклера.
- Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
- Незабавно добавете 90 µl SPB към ямката на всяка проба от BIND1 MIDI плака.
Ако използвате ваничка за дозиране на SPB, включете коефициент на излишък от 1,15, когато аликвотирайте достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SPB бъде добавен към всяка ямка за проба.
- Прехвърлете целия обем (50 µl) на всяка проба от CF PCR плаката в съответната ямка на BIND1 MIDI плаката.
- Изхвърлете празната CF PCR плака.
- Добавете залепващо уплътнение за плака към BIND1 MIDI плаката.

Запечатайте ръбовете и янките напълно.

7. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
8. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
9. Поставете BIND1 MIDI плаката на магнитна стойка за 5 минути.
10. Дръжте плаката на магнитната стойка. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Оставете на магнитната стойка BIND1 MIDI плака и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка.
 - b. Изчакайте 30 секунди.
 - c. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.
2. Измийте топчетата **втори** път.
3. Използвайте пипета с фини върхове, за да отстраните остатъчния EtOH от всяка ямка.
4. Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

1. Отстранете плаката BIND1 MIDI от магнитната стойка.
2. Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
3. Добавете 22 µl RSB към всяка ямка за проба.
4. Добавете залепващо уплътнение за плака към BIND1 MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и янките напълно.
5. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
6. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 2 минути.
7. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
8. Етиктирайте нова 96-ямкова MIDI плака PCF (Пречистени cDNA фрагменти).
Ако спирате на [ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ на страница 50](#), използвайте PCR плака.
9. Прехвърлете 20 µl елуат от всяка ямка за проба на BIND1 MIDI плаката в съответната ямка на PCF плаката.
10. Отстранете празната BIND1 MIDI плака.
11. Добавете 30 µl RSB към всяка ямка за проба на PCF плаката.
12. Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
13. Нанесете залепващо уплътнение за плака върху PCF плаката и я задръжте на студено.
14. Върнете EPH3, FSM, RVT, и SSM за съхранение.

15. Ако обработвате проби, получени само от RNA (cDNA), и не спрете на точката за безопасно спиране, продължете към [Извършване на крайна поправка и A-Tailing на страница 53](#).

ТОЧКА ЗА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

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

Подготовка за протокола

Тази подготовка е необходима за изпълнение на стъпките на протокола, водещи до следващата точка за безопасно спиране.

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

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

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

Фрагментиране на gDNA

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

Подготовка

1. Следвайте препоръките в [Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28](#), за да определите количествено пробите.
2. Подгответе TEB – Обърнете или вортексирайте, за да се смеси.

Процедура

Подгответе плаката

Изберете една от следните опции, за да подгответе плаката:

- Обработвайте gDNA проби едновременно със cDNA (комплементарна DNA) проби в PCF MIDI плаката.
 - a. Етикетирайте PCF MIDI плаката като LP (Library Preparation, Приготвяне на библиотека).
 - b. Дръжте на студено и оставете настрана за употреба в [Прехвърляне на фрагментирана ДНК на страница 52](#).
- Обработвайте gDNA проби едновременно със cDNA проби и PCF PCR плаката е замразена.
 - a. Размразете PCF PCR плаката до стайна температура.

- b. Центрофугирайте при 280 × g в продължение на 1 минута.
 - c. Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
 - d. Етикетирайте 96-ямякова MIDI плака като LP (Library Preparation, Приготвяне на библиотека).
 - e. Прехвърлете всички 50 µl от всяка проба от PCF PCR плаката в съответната ямка на LP MIDI плаката.
 - f. Изхвърлете PCF PCR плаката.
 - g. Нанесете адхезивно уплътнение на плаката и дръжете на студено, до [Прехвърляне на фрагментирана ДНК на страница 52](#).
- Обработвайте само gDNA проби.
 - a. Етикетирайте 96-ямякова MIDI плака като LP (Library Preparation, Приготвяне на библиотека). Ако спирате на [ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ на страница 52](#), използвайте PCR плака.
 - b. Покрийте и оставете настрана за употреба в [Прехвърляне на фрагментирана ДНК на страница 52](#).

Разреждане на gDNA

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

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

Фрагмент

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



ВНИМАНИЕ

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

2. Запишете ориентацията на лентата.
3. Разделете gDNA на фрагменти с ултразвуков апарат.

Прехвърляне на фрагментирана ДНК

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

ТОЧКА НА БЕЗОПАСНО СПИРАНЕ

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

Подготовка за протокола

Тази подготовка е необходима за изпълнение на стъпките на протокола, водещи до следващата точка за безопасно спиране.

Уверете се, че са зададени програми за термоциклери след амплификация. Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).

1. Пригответе ледена кофа или еквивалент.
2. Извадете епруветките с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

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

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
ERA1-A	-25°C до -15°C	Дръжте на студено.	Извършване на крайна поправка и A-Tailing
ERA1-B	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Извършване на крайна поправка и A-Tailing
ALB1	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
LIG3	-25°C до -15°C	Дръжте на студено.	Лигиране на адаптери
SUA1 (синя капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
UMI (бяла капачка)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
STL	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура.	Лигиране на адаптери
EPM	-25°C до -15°C	Дръжте на студено.	PCR индексирание

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

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

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

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

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

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

Извършване на крайна поправка и A-Tailing

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

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

Подготовка

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

Таблица 21 Основна смес ERA1*

Компонент на основна смес	4 библиотеки	8 библиотеки	16 библиотеки	24 библиотеки	48 библиотеки
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

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

- Пипетирайте бавно 10 пъти, за да се постигне хомогенност и след това центрофугирайте за кратко. Поддържайте основната смес ERA1 на студено.
- Изберете една от следните опции, за да подгответе плаката:
 - Ако пробите са в MIDI плака, пригответе както следва.
 - Етикетирайте отново MIDI плаката като LP2 (Library Preparation 2, Приготвяне на библиотека 2).
 - Ако някои проби са в отделни MIDI плаки, преместете всички проби в отделни ямки на една и съща MIDI плака в съответствие с оформлението на плаката.
 - Ако плаката е замразена, пригответе както следва.
 - Размразете PCF PCR плаката или LP PCR плаката до стайна температура.
 - Центрофугирайте плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
 - Пипетирайте 10 пъти, за да се смеси.
 - Етикетирайте нова 96-ямкова MIDI плака като LP2 (Library Preparation 2, Приготвяне на библиотека 2).
 - Прехвърлете всички 50 µl от всяка проба от PCF PCR плаката или LP PCR плаката в съответната ямка на LP2 MIDI плаката.
 - Изхвърлете PCF PCR или LP PCR плаката.

Процедура

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

Лигиране на адаптери

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

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

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

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - ALB1 – Вортексирайте за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - LIG3 – Центрофугирайте за кратко и след това пипетирайте, за да се смесят. Дръжте на студено.
 - SUA1 – Вортексирайте за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - UMI – Вортексирайте за минимум 10 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
 - STL – Оставете настрана, за да се използва в процедурата.

Процедура

1. Отстранете LP2 MIDI плаката от леда или еквивалента.
2. Добавете 60 µl ALB1 към всяка ямка за проба на LP2 MIDI плаката. ALB1 е вискозен разтвор. Пипетирайте бавно, за да сведете до минимум образуването на мехурчета.
3. Добавете 5 µl LIG3 към всяка ямка за проба.
4. Добавете адаптери, както следва.
Не комбинирайте различни типове адаптери.

- [РНК ямки за проба]–Добавете 10 µl SUA1 (синя капачка) към всяка проба, получена от РНК.
 - [ДНК ямки за проба]– Добавете 10 µl UMI (бяла капачка) към всяка проба, получена от ДНК.
5. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
 6. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
 7. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 30 минути.
 8. Вортексирайте STL, за да се смеси, и после центрофугирайте за кратко.
 9. Добавете 5 µl STL към всяка ямка за проба на LP2 MIDI плаката.
 10. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
 11. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.

Почистване на лигиране

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

Подготовка

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

Таблица 22 Пригответе пресен 80% етанол

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

3. Вортексирайте пресен 80% EtOH за смесване.
4. Поставете магнита.

Процедура

Свързване

1. Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
2. Незабавно добавете 112 µl SPB към ямката на всяка проба от LP2 MIDI плаката.

Ако използвате ваничка за дозиране на SPB, включете коефициент на излишък от 1,15, когато аликвотирате достатъчно материал за проба. Изхвърлете останалия материал, след като SPB бъде добавен към всяка ямка за проба.

3. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката LP2 MIDI. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
4. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
5. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
6. Поставете LP2 MIDI плаката на магнитната стойка за поне 10 минути.
7. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Оставете на магнитната стойка плаката LP2 MIDI и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка за проба.
 - b. Изчакайте 30 секунди.
 - c. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.
2. Измийте топчетата **втори** път.
3. Използвайте пипета с фини върхове, за да отстраните остатъчния EtOH от всяка ямка.
4. Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

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

PCR индексирание

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

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - EPM – Дръжте го на студено.
 - UPxx – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко. UPxx е индексният праймер, избран на екрана Create Run (Създаване на изпълняване) в софтуера Local Run Manager по време на настройката на изпълняване.
 - CPxx – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко. UPxx е индексният праймер, избран на екрана Create Run (Създаване на изпълняване) в Local Run Manager софтуера по време на настройката на изпълняване.
2. Уверете се, че индексите за всяка проба съвпадат с планираното изпълняване в Модул за анализ TSO Comprehensive (EU) по време на настройката на изпълняване. Не забравяйте да следвате инструкциите относно избора на индекс в [Брой библиотеки и подбор на индекси на страница 37](#).



ВНИМАНИЕ

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

Процедура

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



ВНИМАНИЕ

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

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



ВНИМАНИЕ

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

7. Центрофугирайте LS PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
8. Поставете върху предварително програмирания термоциклер след амплификация и стартирайте програмата I-PCR.

Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).

Ако продължавате с [Настройване на първата хибридизация на страница 60](#), следвайте инструкциите за размразяване на реагентите в Стъпките за подготовка на протокола.

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

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

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

Подготовка за протокола

Тази подготовка е необходима за изпълнение на стъпките на протокола, водещи до хибридизацията през нощта.

1. Уверете се, че са зададени програми за термоциклери след амплификация. Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).
2. Извадете епруветките с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

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

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
TCB1	2°C до 8°C	Оставете до достигане на стайна температура.	Настройване на първата хибридизация

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

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

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

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

Настройване на първата хибридизация

По време на този процес пул от олигонуклеотиди хибридизира със cDNA библиотеки и пул от олигонуклеотиди хибридизира с gDNA библиотеки, приготвени в [PCR индексване на страница 58](#). Обогащването на целевите региони изисква две стъпки на хибридизация. При първата хибридизация олигонуклеотидите хибридизират със cDNA библиотеки и/или gDNA библиотеки за следващия ден (8 часа до 24 часа).

Подготовка

1. Подгответе посочените по-долу реагенти.

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

Процедура

1. Прехвърлете 20 µl от всяка cDNA и/или gDNA библиотека от ALS PCR плаката в съответната ямка в HYB1 PCR плаката.
2. Нанесете залепващо уплътнение върху ALS PCR плаката и оставете настрана. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
3. Проверете TCB1 за утайки. Ако има, загрейте епруветката отново и разбъркайте епруветката, докато кристалите се разтворят.
4. Добавете 15 µl TCB1 към всяка библиотечна ямка в HYB1 PCR плаката.
5. Добавете 10 µl TCA1 към всяка библиотечна ямка в HYB1 PCR плаката.
6. Добавете сонди.
Не комбинирайте различни типове сонди. Добавете само по един комплект сонда на ямка.
 - **[Ямки с РНК библиотеки]**—Добавете 5 µl OPR1 (червена капачка) към всяка библиотека, получена от РНК.
 - **[Ямки с ДНК ямки в библиотеки]**—Добавете 5 µl OPD2 (бяла капачка) към всяка библиотека, получена от ДНК.
7. Нанесете залепващо уплътнение за плака върху HYB1 PCR плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
8. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
9. Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата за HYB1.
Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).
10. Хибридизирайте при 57°C в продължение на поне 8 часа до най-много 24 часа.
11. Върнете хибридизационните реагенти за съхранение.
12. Съхранявайте ALS PCR плаката при -25°C до -15°C в продължение на до 30 дни.

Подготовка за протокола

Тази подготовка е необходима за изпълнение на стъпките на протокола, водещи до следващата точка за безопасно спиране.

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

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

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

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

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

Таблица 28 TruSight Oncology Comp Content Set Box (част № 20031122)

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

Целево улавяне – първа част

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

Подготовка

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

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

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

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

4. Вортексирайте сместа за елуиране EE2 + HP3 и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана за стъпката [Елуиране на страница 65](#).
5. Поставете етикет CAP1 (улавяне 1) на нова 96-ямкова MIDI плака.
6. Поставете магнита.

Процедура

Свързване

1. Отстранете HYB1 PCR плаката от термоциклера.
2. Центрофугирайте HYB1 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
3. Вортексирайте SMB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата. Ако има утайка или гранули, не забравяйте да достигнете стайна температура, пипетирайте нагоре и надолу, за да освободите гранулите и след това вортексирайте, за да ресуспендирате.
4. Незабавно добавете 150 µl SMB към всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI.

Ако използвате ваничка за дозиране на SMB, включете коефициент на излишък от 1,15, когато аликвотирате, за да остане достатъчно материал за проба.

5. Изхвърлете целия останал материал, след като SMB бъде добавен към всяка ямка за проба.
6. Настройте пипетата на 50 µl и прехвърлете целия обем на всяка библиотека от HYB1 PCR плаката в съответната ямка на плаката CAP1 MIDI.
7. Изхвърлете празната HYB1 PCR плака.
8. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
9. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
10. Инкубирайте в предварително загрят инкубатор за микропроби при 57°C за 25 минути.
11. Поставете CAP1 MIDI плаката на магнитна стойка за 2 минути.
12. Дръжте плаката на магнитната стойка. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.



ВНИМАНИЕ

Пристъпете незабавно към следващата стъпка ([Измиване на страница 65](#)). Не оставяйте гранулата да престоява продължително време без наличие на течност.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Отстранете CAP1 MIDI плаката от магнитната стойка.
 - b. Добавете 200 µl EEW към всяка ямка.
 - c. Използвайте пипета, настроена на 150 µl, и пипетирайте, за да разбъркате минимум 10 пъти. Уверете се, че всички топчета са повторно суспендирани. Уверете се, че няма гранули, като внимателно аспирирате общия разтвор на топчетата от ямката в крайника. Визуално проверете дъното на всяка ямка. Ако има гранула, наклонете крайника на пипетата към гранулата по време на стъпките за измиване, за да изтласкате гранулата. Уверете се, че гранулата е напълно потопена в разтвор. Разтворът трябва да изглежда тъмнокафяв и да има хомогенна консистенция.
 - d. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI.
 - e. Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
 - f. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 4 минути.
 - g. Инкубирайте в инкубатор за микропроби при 57°C за 5 минути.
 - h. Поставете CAP1 MIDI плаката на магнитна стойка за 2 минути.
 - i. Дръжте плаката на магнитната стойка. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.
2. Измийте топчетата **втори** път.
3. Измийте топчетата **трети** път.
4. Използвайте пипета с фини върхове, за да отстраните остатъчния EEW от всяка ямка.

Елуиране

1. Отстранете CAP1 MIDI плаката от магнитната стойка.
2. Вортексирайте прясна смес за елуиране EE2 + HP3 и след това центрофугирайте за кратко.
3. Внимателно добавете 17 µl смес за елуиране EE2 + HP3 към всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI.
4. Изхвърлете останалата смес за елуиране EE2 + HP3.
5. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP1 MIDI. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
6. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
7. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
8. Поставете етикет ELU1 (елуиране 1) на нова 96-ямкова PCR плака.
9. Вортексирайте ET2, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
10. Добавете 5 µl ET2 във всяка съответна ямка с библиотека в новата плака ELU1 PCR.

- Внимателно прехвърлете 15 µl елуат от всяка ямка с библиотека на плаката CAP1 MIDI в съответната ямка на плаката ELU1 PCR.
- Изхвърлете празната плака CAP1 MIDI.
- Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката ELU1 PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
- Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
- Върнете EEW за съхранение.

Настройване на втората хибридизация

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

Подготовка

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

Процедура

- Проверете TCB1 за утайки. Ако има кристали, загрейте епруветката отново и вортексирайте, докато кристалите се разтворят.
- Добавете 15 µl TCB1 към всяка ямка на библиотека на плаката ELU1 PCR.
- Добавете 10 µl TCA1 към всяка ямка на библиотека.
- Добавете същата сонда, използвана по време на първата хибридизация, към всяка ямка. Добавете само по един комплект сонда на ямка.
Не комбинирайте различни типове сонди.
 - [Ямки с РНК библиотеки]**—Добавете 5 µl OPR1 (червена капачка) към всяка библиотека, получена от РНК.
 - [Ямки с ДНК ямки в библиотеки]**—Добавете 5 µl OPD2 (бяла капачка) към всяка библиотека, получена от ДНК.
- Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката ELU1 PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.

6. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
7. Поставете върху термоциклера и стартирайте програмата HYB2.
Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).
8. Хибридизирайте при 57°C в продължение на поне 1,5 часа до най-много 4 часа.
9. Върнете хибридационните реагенти за съхранение.

Целево улавяне – втора част

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

Подготовка

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

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

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

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

4. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко. Оставете настрана за стъпката [Елуиране на страница 69](#).
5. Поставете етикет CAP2 (улавяне 2) на нова 96-ямкова MIDI плака.
6. Поставете магнита.

Процедура

Свързване

1. Отстранете ELU1 PCR плаката от термоциклера.
2. Центрофугирайте ELU1 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
3. Вортексирайте SMB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
Ако има утайка или гранули, не забравяйте да достигнете стайна температура, пипетирайте нагоре и надолу, за да освободите гранулите и след това вортексирайте, за да ресуспендирате.
4. Незабавно добавете 150 µl SMB към всяка ямка за библиотека на плаката CAP2 MIDI.
Ако използвате ваничка за дозиране на SMB, включете коефициент на излишък от 1,15, когато аликвотирайте, за да остане достатъчно материал за проба.
5. Изхвърлете целия останал материал, след като SMB бъде добавен към всяка ямка за проба.
6. Настройте пипетата на 50 µl и прехвърлете целия обем на всяка библиотека от плаката ELU1 PCR в съответната ямка на плаката CAP2 MIDI.
7. Изхвърлете празната ELU1 PCR плака.
8. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
9. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
10. Инкубирайте в инкубатор за микропроби при 57°C за 25 минути.
Ако продължите с [Усилване на обогатена библиотека на страница 71](#), следвайте инструкциите за размразяване на реагентите в раздела [Подготовка за протокола](#).
11. Поставете на магнитна стойка за 2 минути.
12. Дръжте плаката CAP2 MIDI на магнитната стойка. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.



ВНИМАНИЕ

Пристъпете незабавно към следващата стъпка ([Измиване на страница 68](#)). Не оставяйте гранулата да престоява продължително време без наличие на течност.

Измиване

1. Отстранете плаката CAP2 MIDI от магнитната стойка.
2. Обърнете или вортексирайте RSB, за да се смеси.
3. Добавете 200 µl RSB към всяка ямка.
4. Добавете залепващ уплътнител за плака към плаката CAP2 MIDI.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
5. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 4 минути.

6. Поставете плаката на магнитната стойка за 2 минути.
7. Дръжте плаката на магнитната стойка. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.
8. Използвайте пипета с фини върхове, за да отстраните остатъчния RSB от всяка ямка.

Елуиране

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

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

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

Подготовка за протокола

Тази подготовка е необходима за изпълнение на стъпките на протокола, водещи до следващата точка за безопасно спиране.

1. Пригответе ледена кофа или еквивалент.
2. Извадете епруветките с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

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

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

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

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

Усилване на обогатена библиотека

Тази стъпка използва праймери, за да усили обогатените библиотеки.

Подготовка

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

Процедура

1. Вортексирайте PPC3, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
2. Добавете 5 µl PPC3 към всяка ямка на библиотека на ELU2 PCR плаката.
3. Вортексирайте EPM за 5 секунди, за да се смесят, и след това центрофугирайте за кратко.
4. Добавете 20 µl EPM към всяка ямка на библиотека.
5. Добавете залепващо уплътнение за плака към плаката ELU2 PCR.
Запечатайте ръбовете и ямките напълно, за да предотвратите изпаряване.
6. Разбъркайте на 1200 об./мин в продължение на 2 минути.
7. Поставете термоциклер и стартирайте програмата EL-PCR.
Вижте [Програмни термоциклери на страница 43](#).
Ако продължавате с [Нормализиране на библиотеките на страница 74](#), следвайте инструкциите за размразяване в раздела [Подготовка за протокола](#).
8. Върнете PPC3 и EPM за съхранение.

Изчистване на усилен обогатена библиотека

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

Подготовка

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

Таблица 33 Пригответе пресен етанол 80%

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

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

Процедура

Свързване

1. Отстранете ELU2 PCR плаката от термоциклера.
2. Центрофугирайте ELU2 PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута.
3. Вортексирайте SPB за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата.
4. Незабавно добавете 110 µl SPB към всяка ямка за библиотека на BIND2 MIDI плака.
5. Прехвърлете 50 µl от всяка библиотека от ELU2 PCR плака в съответната ямка на BIND2 MIDI плака.
6. Изхвърлете празната ELU2 PCR плака.
7. Добавете залепващо уплътнение за плака към BIND2 MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
8. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 2 минути.
9. Инкубирайте на стайна температура в продължение на 5 минути.
10. Поставете BIND2 MIDI плаката на магнитна стойка за 5 минути.
11. Дръжте плаката на магнитната стойка. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Оставете на магнитна стойка BIND2 MIDI плака и добавете 200 µl пресен 80% EtOH във всяка ямка.
 - b. Изчакайте 30 секунди.
 - c. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.
2. Измийте топчетата **втори** път.
3. Използвайте пипета с фини върхове, за да отстраните остатъчния EtOH от всяка ямка.
4. Изхвърлете неизползвания 80% EtOH.

Елуиране

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

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

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

Подготовка за протокола

Тази подготовка е необходима за изпълнение на стъпките на протокола, водещи до следващата точка за безопасно спиране.

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

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

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

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

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

2. Ако на същия ден продължавате с [Приготвяне за Sequencing \(Секвениране\)](#) на страница 78, следвайте инструкциите за размразяване в раздела [Подготовка за протокола](#).

Нормализиране на библиотеките

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

Подготовка

- Подгответе посочените по-долу реагенти.
 - LNB1 – Уверете се, че топчетата са оставени на стайна температура за 30 минути.
 - LNA1 – Вортексирайте, за да се смесят.
 - EE2 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугируйте за кратко.
 - HP3 – Вортексирайте, за да се смесят, и след това центрофугируйте за кратко.
 - LNW1 – Вортексирайте, за да се смесят. Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
 - LNS1 – Вортексирайте, за да се смесят. Оставете настрана, за да се използва в процедурата.
- Вортексирайте LNB1 за 1 минута, за да суспендирате повторно топчетата. Обърнете епруветката LNB1, за да сте сигурни, че всички топчета са повторно суспендирани.
- Използвайте пипета, настроена на 800 µl, за да пипетирате LNB1 нагоре и надолу 10 пъти, за да осигурите повторно суспендиране.
- Незабавно пригответе прясна основна смес LNA1 + LNB1 в конична епруветка.

**ВНИМАНИЕ**

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

Таблица 36 Основна смес LNA1 + LNB1*

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

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

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

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

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

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

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

Процедура

Свързване

- Вортексирайте основната смес LNA1+LNB1.
- Незабавно добавете 45 µl основна смес LNA1 + LNB1 към всяка ямка за библиотека на BBN MIDI плаката.
- Изхвърлете останалата основна смес LNA1 + LNB1.
- Добавете 20 µl към всяка библиотека от PL PCR плаката към съответната ямка от BBN MIDI плаката.
- Добавете залепващ уплътнител за плака към BBN MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
- Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 30 минути.

7. Нанесете залепващ уплътнител за плака към PL PCR плаката и върнете за съхранение.
8. Поставете BBN MIDI плаката на магнитна стойка за 2 минути.
9. Дръжте плаката на магнитната стойка. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.

Измиване

1. Измийте топчетата по описания по-долу начин.
 - a. Отстранете BBN MIDI плаката от магнитната стойка.
 - b. Добавете 45 µl LNW1 към всяка ямка на библиотека.
 - c. Добавете залепващ уплътнител за плака към BBN MIDI плаката. Запечатайте ръбовете и ямките напълно.
 - d. Разбъркайте на 1800 об./мин в продължение на 5 минути.
 - e. Поставете BBN MIDI плаката на магнитна стойка за 2 минути.
 - f. Дръжте плаката на магнитната стойка. Използвайте пипета, настроена на 200 µl, за да премахнете и изхвърлите всякакъв супернатант от всяка ямка за проба, без да се нарушава гранулата.
2. Измийте топчетата *втори* път.
3. Използвайте пипета с фини върхове, за да отстраните остатъчния супернатант от всяка ямка.

Елуиране

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



ВНИМАНИЕ

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

10. Изхвърлете празната BBN MIDI плака.

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

БЕЗОПАСНА ТОЧКА ЗА СПИРАНЕ

Ако спирате, центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 32 дни.

Подготовка за протокола

Тази подготовка е необходима за изпълнение на стъпките на протокола, водещи до секвениране.

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

1. Извадете Library Dilution Buffer (HT1) от съхранението при -25°C до -15°C . Размразете до стайна температура. След размразяване, поддържайте студено.
2. Следвайте инструкциите за приготвяне в *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)* за други консумативи в комплекта.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 цикъла)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 цикъла)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 цикъла)
3. Извадете епруветките с реагенти от кутията и следвайте инструкциите за размразяване.

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

Реагент	Съхранение	Инструкции за размразяване	Стъпка от протокола
PhiX Internal Control (PH3 или PhiX)	-25°C до -15°C	Размразете до стайна температура. След размразяване, поддържайте студено.	Приготвяне за Sequencing (Секвениране)

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

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

Приготвяне за Sequencing (Секвениране)

Всяко изпълняване на секвениране на ДНК и РНК трябва да включва положителна контрола и NTC. Всяко NTC за ДНК и РНК се секвенира многократно, ако е необходимо, така че всяко изпълняване да съдържа NTC. Всяка изпълняване за ДНК и РНК включва отделна положителна контрола.

Подготовка

1. Прегледайте насоките в [Брой библиотеки и подбор на индекси на страница 37](#).
2. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка dHP3 (разреден HP3).

3. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка dPhiX (разреден PhiX).
4. Загрейте топлинния блок до 96°C за микроцентрифужните епруветки.
5. Пригответе ледена кофа или еквивалент.

Разреждане и денатуриране на контролата PhiX

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

Пулиране и денатуриране на библиотеки за TSO Comprehensive (EU)

1. Ако NL PCR плаката е била съхранявана, размразете до стайна температура и след това центрофугирайте плаката на 280 × g за 1 минута.
2. Като използвате многоканална пипета, настроена на 30 µl, внимателно смесете с пипета библиотеките в плаката NL PCR пет пъти.
Използвайте нови накрайници за всяка библиотека.



ВНИМАНИЕ

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

3. Изберете една от следните опции за пулиране, денатуриране и разреждане на библиотеките.

- [Опция №1] Едновременно секвенирайте библиотеки, получени от РНК проби и ДНК проби. Вижте [Опция 1: Съвместно използване на DNA и RNA библиотеки на страница 80](#)
- [Опция №2] Секвениране на библиотеки, получени само от ДНК проби. Вижте [Опция 2: Само библиотеки с DNA на страница 81](#).
- [Опция 3] Секвениране на библиотеки, получени само от РНК проби. Вижте [Опция 3: Библиотеки само RNA на страница 82](#).

Опция 1: Съвместно използване на DNA и RNA библиотеки

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

Приготвяне на първото разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка DIL1 (разреждане 1).
2. Прехвърлете 20 µl от PDL в празната епруветка DIL1.
3. Добавете 5 µl от PRL в епруветката DIL1.
4. Изхвърлете епруветките PDL и PRL.
5. Добавете 475 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL1 (разреждане 1:20).
6. Вортексирайте DIL1 епруветката, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.

Приготвяне на второто разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка от 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
2. Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.

3. Изхвърлете епруветката DIL1.
4. Добавете 1660 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:850).
5. Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
6. Добавете 2,5 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
7. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
8. Заредете 1300 µl от DIL2 в размразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 цикъла).
За повече информация, вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.
9. Изхвърлете епруветката DIL2.
10. Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и след това съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 32 дни.
11. Пристъпете към секвенирането.
За повече информация, вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.

Опция 2: Само библиотеки с DNA

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

Приготвяне на първото разреждане

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

Приготвяне на второто разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка от 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
2. Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.
3. Изхвърлете епруветката DIL1.
4. Добавете 1660 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:850).
5. Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX и след това центрофугирайте за кратко.
6. Добавете 2,5 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
7. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
8. Заредете 1300 µl от DIL2 в размразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 цикъла).
За повече информация, вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.
9. Изхвърлете епруветката DIL2.
10. Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и след това съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период до 32 дни.
11. Пристъпете към секвенирането.
За повече информация, вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.

Опция 3: Библиотеки само RNA

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

Приготвяне на първото разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка DIL1 (разреждане 1).
2. Прехвърлете 10 µl от PRL в празната епруветка DIL1.

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

Приготвяне на второто разреждане

1. Етикетирайте микроцентрифужна епруветка от 2,0 ml DIL2 (разреждане 2).
2. Прехвърлете 40 µl от DIL1 в празната епруветка DIL2.
3. Изхвърлете епруветката DIL1.
4. Добавете 1646 µl предварително охладен HT1 в епруветката DIL2 (разреждане 1:843).
5. Вортексирайте приготвен 20 pM dPhiX и след това центрофугирайте за кратко.
6. Добавете 16,7 µl от приготвен 20 pM dPhiX в епруветката DIL2.
7. Вортексирайте, за да се смеси, и след това центрофугирайте за кратко.
8. Заредете 1300 µl от DIL2 в размразената касета с реагенти NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 цикъла).
За повече информация, вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.
9. Изхвърлете епруветката DIL2.
10. Центрофугирайте NL PCR плаката при 280 × g в продължение на 1 минута и съхранявайте при температура от -25°C до -15°C за период от до 32 дни.
11. Пристъпете към секвенирането.
За повече информация, вижте *Ръководство за справка на инструмента NextSeq 550Dx (документ №1000000009513)*.

Интерпретиране на резултатите

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

На ниво изпълнение се генерират следните изходни файлове:

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

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

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

Резултати от съвместна диагностика

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

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

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

Варианти за профилиране на тумори

TSO Comprehensive (EU) е създаден за отчитане на соматични варианти, когато се отчитат варианти с доказателство за клинично значение или варианти с потенциално клинично значение. Софтуерът за анализ TSO Comprehensive (EU) използва БЗ, която определя дали всеки открит и допустим вариант ([Таблица 2](#)) е с клинично значение или с потенциално клинично значение въз основа на доказателства за терапевтични, диагностични или прогностични асоциации. БЗ също така взема предвид дали са установени (или не) асоциации в тествания тип тумор. Асоциациите за предразположеност към или риск от рак не са включени в БЗ. Често срещани полиморфизми са премахнати.

За варианти за профилиране на тумор положителните резултати се класифицират в Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance (Геномни находки с доказателства за клинично значение) (Ниво 2) или Genomic Findings with Potential Clinical Significance (Геномни находки с потенциално клинично значение) (Ниво 3) според инсталираната БЗ и идентифицирания тип тумор.

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

Качествен контрол

- За информация за количествено определяне на нуклеинова киселина и минимални изисквания за входен материал, вижте [Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28](#).
- Изпълняването на секвениране и валидността на пробата се определят автоматично и се отчитат от Модул за анализ TSO Comprehensive (EU). За подробна информация за анализа, вижте *Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661)*.
- Отчетът TSO Comprehensive (EU), който е наличен във формати PDF и JSON, обобщава резултатите от контрола на качеството. Файловете с отчетите са в папката за анализ. Вижте *Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661)* за местоположението на папката за анализ (съдържа PDF и JSON отчети) и папката за изпълнение.

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

Тип изходни данни	Измерване	Спецификация	Описание	Влияние на неуспех на спецификацията*
Изпълняване на секвениране	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Процент на разчитания, преминаващи филтър (PF).	Невалидно изпълнение на секвениране. Няма докладвани резултати за никоя проба в изпълнението.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Средният процент на базови обозначения с резултат за качество Q30 или по-висок за Разчитане 1.	Невалидно изпълнение на секвениране. Няма докладвани резултати за никоя проба в изпълнението.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Средният процент на базови обозначения с резултат за качество Q30 или по-висок за Разчитане 2.	

Тип изходни данни	Измерване	Спецификация	Описание	Влияние на неуспех на спецификацията*
ДНК библиотеки	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 ИЛИ > 3106 и $P_VALUE \leq 0,049$	Измерване, което оценява вероятността за контаминация, като използва VAF на често срещани варианти. Резултатът за контаминация е базиран на разпределението на VAF за SNP. Стойността P на контаминация се използва за оценка на силно пренаредени геноми. Това е приложимо само когато резултатът от контаминацията е над горната граница на спецификациите.	Няма отчетени ДНК резултати.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Средната дължина на фрагмента в пробата.	Няма отчетени резултати за TMB или за малки варианти на ДНК.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (количество)	≥ 150	Средно покритие на фрагменти на екзона сред всички бази на екзона.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Процент екзонни бази с покритие на фрагмента 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (количество)	≥ 40	Броят на MSI места, които може да се използват за MSI обозначаване (Брой на микросателитните места с достатъчно обхващащи разчитания за идентифициране на микросателитна нестабилност).	Няма отчетени MSI резултати.

Тип изходни данни	Измерване	Спецификация	Описание	Влияние на неуспех на спецификацията*
	COVERAGE_MAD (количество)	$\leq 0,210$	Средната стойност на абсолютните отклонения от средната стойност на нормализирания брой за всеки CNV целеви регион.	Няма отчетени резултати за гена амплификация.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (количество)	$\geq 1,0$	Средната стойност на необработения брой пакети за CNV цел.	
РНК библиотеки	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Средната дължина на фрагмента в пробата.	Няма отчетени резултати за сливания или сплайс варианти.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (коефициент)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X е мярка за еднородност на покритието. За всеки ген с покритие най-малко 500x е изчислен коефициентът на вариация в покритието по тялото на гена. Това измерване е медианата на тези стойности. Висока стойност посочва високо ниво на вариация и посочва проблем в приготвянето на библиотеката, като например ниско въвеждане на проба и/или проблеми при утаяване със сонда. Това измерване се изчислява, като се използват всички разчитания (включително разчитания, отбелязани като дублирани).	

Тип изходни данни	Измерване	Спецификация	Описание	Влияние на неуспех на спецификацията*
	TOTAL_ON_TARGET_READS (количество)	$\geq 9\,000\,000$	Общият брой разчитания, които картографират целевите региони. Това измерване се изчислява, като се използват всички разчитания (включително разчитания, отбелязани като дублирани).	

* Успешните резултати показват PASS (ПРЕМИНАВА).

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

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

* Успешните резултати показват PASS (ПРЕМИНАВА).

- Повторете изпълненията на секвениране, които са невалидни.
- Повторете тестовете на библиотеки със следните резултати:
 - Замърсени ДНК библиотеки
 - Невалидни РНК библиотеки
 - Тестовете могат да бъдат повторени, за да се получат повече резултати за варианти или биомаркери за ДНК библиотеки, които са били анулирани за един, но не за всички типове варианти.

- Положителните контроли се оценяват за обозначаване на вариант. Ако положителните контроли не отговарят на спецификациите за обозначаване на варианта, анулирайте ръчно изпълняването на секвениране. Софтуерът на модула за анализ не анулира автоматично проби от пациенти въз основа на резултатите от контролните проби.
- NTC се оценяват спрямо средното покритие на екзон за DNA и гени над средната граница за PHK. Ако отрицателните контроли не отговарят на спецификациите, анулирайте ръчно събитието за приготвяне на библиотеката и всички свързани изпълнявания на секвениране. Софтуерът на модула за анализ не анулира автоматично проби от пациенти въз основа на резултатите от контролните проби.
- Извършете допълнителни мерки за контрол на качеството в съответствие с местните, щатските и/или федералните разпоредби или изискванията за акредитация.

За повече информация относно повтарящи се изпълнявания на секвениране или тестове на библиотеки, вижте [Отстраняване на неизправности на страница 90](#).

Отстраняване на неизправности

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

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
Изпълняването на секвениране не преминава спецификациите за контрол на качеството.	<ul style="list-style-type: none"> Грешка при пулиране Грешка при разреждане Непълна топлинна денатурация на PRL/PDL Проблеми с приготвянето на консумативи за секвениране (например, неразмразени адекватно, кондензация/отпадъци върху поточната клетка) 	<ul style="list-style-type: none"> Секвенирайте повторно библиотеките от PCR плаката за нормализация на библиотеки (NL). Вижте Приготвяне за Sequencing (Секвениране) на страница 78.
	<ul style="list-style-type: none"> Неправилна употреба на сонди за обогатяване (например OPR1 сонди, използвани за DNA проби, OPD2 сонди, използвани за RNA проби) Грешка в работния процес за подготовка на библиотека по време на или след първата стъпка на хибридизация. 	<p>Повторете отново стъпките за обогатяване на библиотеките от PCR плаката с проби на усилени библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 60.</p>
	Изискванията за въвеждане на проба не бяха изпълнени	Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Денатуриране и отгряване на RNA на страница 45 или Фрагментиране на gDNA на страница 50.

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
	Грешка в работния процес за подготовка на библиотека по време на или преди стъпката за индексирание на PCR	Повторете отново стъпките за обогатяване на библиотеките от PCR плаката с проби на усиленни библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 60 .
	Проблем с инструмента	Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina.
Грешка при генериране на отчет или обща грешка в инструмента (мрежова грешка, грешки при зареждане/разтоварване на реагенти и т.н.)	Проблем със софтуера или инструмента.	Вижте Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager (документ № 200008661) за помощ при генериране на отчети. Свържете се с отдела за техническа поддръжка на Illumina за допълнителна помощ.
ДНК библиотеката не преминава спецификациите за контрол на качеството.	Изискванията за въвеждане на проба не бяха изпълнени.	Осигурете подходящо въвеждане на пробата и повторете приготвянето на библиотеката от стъпката на фрагментиране на gDNA. Вижте Изисквания за пробите на страница 26 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28 .

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
	Грешка при използване или оборудване в работния процес на анализа.	<p>Повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване.</p> <ul style="list-style-type: none"> Секвенирайте повторно библиотеките от PCR плаката за нормализация на библиотеки (NL). Вижте Приготвяне за Sequencing (Секвениране) на страница 78. Повторете отново стъпките за обогатяване на библиотеките от PCR плаката с проби на усиленни библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 60. Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Фрагментиране на gDNA на страница 50.
	Критериите за CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE не са изпълнени.	<p>Прегледайте „Предупреждения и предпазни мерки“ за информацията относно избягването на кръстосано замърсяване.</p> <p>Прегледайте оформлението на плаката и индексирването на библиотеката, за да се уверите, че библиотеки с един и същи индекс не са секвенирани заедно.</p> <p>За засегнатите библиотеки започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Фрагментиране на gDNA на страница 50.</p> <p>Може да е настъпило замърсяване по време на извличането на пробата. Може да се наложи повторно извличане, за да е сигурно, че пробата не е замърсена.</p>

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
	Използваемият MSI е неуспешен.	<p>Прегледайте настройките на производителя на ултразвуковия апарат за употреба и работа (включително нивото на водата и типа на епруветката).</p> <p>Осигурете подходящо въвеждане на пробата в анализа.</p> <p>Вижте Изисквания за пробите на страница 26 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28.</p> <p>Може да се наложи екстракция на нова проба и/или повторение на стъпката на фрагментиране на gDNA, ако пробата е прекалено фрагментирана или повредена.</p>
	Пробата е прекалено фрагментирана или има увреждане на нуклеинова киселина, което влияе върху способността за генериране на достатъчно уникални библиотеки.	<p>Прегледайте Настройки за конфигуриране на ултразвуков апарат за фрагментация на ДНК на страница 23 и настройките на производителя на ултразвуковия апарат за употреба и работа (включително нивото на водата и типа на епруветката).</p> <p>Осигурете подходящо въвеждане на пробата в анализа.</p> <p>Вижте Изисквания за пробите на страница 26 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28.</p> <p>Може да се наложи екстракция на нова проба и/или повторение на стъпката на фрагментиране на gDNA, ако пробата е прекалено фрагментирана или повредена.</p>
РНК библиотеката не преминава спецификациите за контрол на качеството.	Изискванията за въвеждане на проба не са изпълнени.	<p>Осигурете подходящо въвеждане на пробата и повторете приготвянето на библиотеката от стъпката Денатуриране и отгряване на РНК.</p> <p>Вижте Изисквания за пробите на страница 26 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28.</p>

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
	Грешка при използване или оборудване в работния процес на анализа.	<p>Повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване.</p> <ul style="list-style-type: none"> Секвенирайте повторно библиотеките от PCR плаката за нормализация на библиотеки (NL). Вижте Приготвяне за Sequencing (Секвениране) на страница 78. Повторете отново стъпките за обогатяване на библиотеките от PCR плаката с проби на усилени библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 60. Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Денатуриране и отгряване на RNA на страница 45.
	Пробата може да е прекалено фрагментирана или да има увреждане на нуклеинова киселина, което влияе върху способността за генериране на достатъчно уникални библиотеки.	<p>Осигурете подходящо въвеждане на пробата. Вижте Изисквания за пробите на страница 26 и Екстракция на нуклеинова киселина, количествено определяне и съхранение на страница 28.</p> <p>Може да се наложи екстракция на нова проба, ако пробата е прекалено фрагментирана или повредена.</p>

Наблюдение	Възможна причина	Препоръчително действие
Неуспех на положителната контрола (ДНК/РНК).	Изискванията за въвеждане на проба за положителната контрола не са изпълнени.	<p>Осигурете подходящо въвеждане в анализа. Прегледайте оформлението на плаката и се уверете, че подходящите реагенти (сонди, индекси) са в подходящите ямки. Уверете се, че положителната контролна проба се съхранява в съответствие с етикета. За всички проби, които споделят положителната контрола, повторете приготвянето на библиотеката от една от следните стъпки в зависимост от това къде е възникнала предполагаема грешка при използване или грешка в оборудването. Ако са неизвестни или възникнат други грешки, свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да отстраните неизправностите при изпълняване.</p> <ul style="list-style-type: none"> Секвенирайте повторно библиотеките от PCR плаката за нормализация на библиотеки (NL). Вижте Приготвяне за Sequencing (Секвениране) на страница 78. Повторете отново стъпките за обогатяване на библиотеките от PCR плаката с проби на усиленни библиотеки (Amplified Libraries Samples, ALS). Вижте Настройване на първата хибридизация на страница 60. Започнете приготвянето на библиотеката от началото на работния процес. Вижте Денатуриране и отгряване на RNA на страница 45 или Фрагментиране на gDNA на страница 50.
	Грешка при използване или оборудване в работния процес на анализа.	

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

Функционални характеристики

TSO Comprehensive (EU) е таргетен NGS панел, откриващ изменения в 517 гена. Малки варианти на ДНК – еднонуклеотидни варианти (SNV), многонуклеотидни варианти (MNV), инсерции и делеции – са допустими за отчитане от всички 517 гена. Туморно мутационно натоварване се отчита като резултат въз основа на брой соматични варианти без водач на мегабаза (вижте *Ръководство за работния процес на модула за анализ на TruSight Oncology Comprehensive (EU) в Local Run Manager* (документ № 200008661) за подробности). MSI се отчита като статус. Генните амплификации са допустими за отчитане от MET и ERBB2 гените. Сливането е пригодно за докладване от 23-те гена, посочени в [Обобщение и обяснение на анализа на страница 1](#). Сплайс вариантите са допустими за отчитане от MET и EGFR гените. За да бъдат отчетени, вариантите трябва да бъдат открити и да са с доказателства в БЗ на анализа TSO Comprehensive (EU) и да бъдат допустими въз основа на тествания тип тъкан. За да бъдат докладвани, NTRK сливанията изискват партньорът за сливане да бъде 5' и NTRK киназният домейн да е непокътнат.

За малките варианти на ДНК е проведен представителен подход за валидиране на целевите гени в панела с данни, представляващи SNV, MNV, инсерции и делеции. За генни амплификации, сливания и сплайс варианти тестването е извършено на ниво ген. TMB и MSI са оценени, където са посочени. За

исканията за CDx на NTRK, сливания в FFPE проби бяха тествани в проучвания, фокусирани върху характеристиките, специфични за искането (като граница на откриване, прецизност в рамките на лабораторията, възпроизводимост, точност и клинична производителност).

Таблица 42 са дадени дефинициите на показателите, изчислени в различните проучвания.

Таблица 42 Дефиниции на показателите

Термин	Дефиниция
Положително процентно съответствие (PPA)	Процентът на правилно идентифицираните положителни резултати от общия брой положителни резултати, сравнен по ортогонален метод.
Отрицателно процентно съответствие (NPA)	Процентът на правилно идентифицираните отрицателни резултати от общия брой отрицателни резултати, сравнен по ортогонален метод.
Общо процентно съответствие (OPA)	Процентът на правилно идентифицираните положителни и отрицателни резултати от общия брой наблюдавани резултати, сравнен по ортогонален метод.
Процент на положителни обозначавания (PPC)	Процент на наблюденията, които са положителни за дадена цел, сред наблюденията, които се очаква да бъдат положителни за целта.
Процент отрицателни обозначавания (PNC)	Процент на наблюденията, които са отрицателни за дадена цел, сред наблюденията, които се очаква да бъдат отрицателни за целта.
n/N	Броят на положителните или отрицателните наблюдения (n), разделен на общо наблюденията (N), за да се изчисли съответно PPC или PNC. Стойностите на n и N могат да бъдат на различни нива (напр. вариант или ген) или комбинирани в група (напр. SNV).
Стандартно отклонение (SD)	Мярка за размера на вариацията на стойностите на променливата около нейната средна стойност.
Процентен коефициент на вариация (%CV)	Стандартно отклонение, разделено на средната стойност като процент.

Кръстосано замърсяване

Проучването на кръстосано замърсяване беше проведено, за да се оцени дали се появяват фалшиво положителни резултати, дължащи се на замърсяване от ямка до ямка по време на приготвянето на библиотеката с проби, както и замърсяване между последователни изпълнявания на секвениране. Този анализ е направен за малки варианти на ДНК (които също влияят на TMB), сливания, генни амплификации и MSI. Библиотеките бяха подготвени в оформление на табло с редуващи се проби за оценка на замърсяването от ямка до ямка и с редуващи се индекси за оценка на замърсяване от изпълняване до изпълняване на секвениране, когато се секвенират последователно на същия Инструмент NextSeq 550Dx. Проучването на кръстосано замърсяване показва нулеви събития на замърсяване, наблюдавани при изследване на откритите варианти във всяка проба, без открити фалшиво положителни резултати.

Два показателя за КК (CONTAMINATION_SCORE и P_VALUE) са проектирани за анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на замърсяване на пробата в пробите от DNA. Оценена е чувствителността за откриване на замърсяване. Пробите от FFPE туморна DNA се смесват с различни количества FFPE нормални DNA проби, за да се създадат целенасочено замърсени проби.

Генерирани са общо 1112 наблюдения за замърсяване и е открито замърсяване в 95% (1054) от наблюденията. Честотата на детекция е увеличена до 96% (939/976), когато процентът на замърсяване е между 10% и 90% (маса/маса). От 37-те наблюдения между 10% и 90% замърсяване, при които не е открито замърсяване, 12 не отговарят на спецификацията за покритие, за да се нарекат малки варианти на DNA. Ниското покритие пречи на детекцията на замърсяване, но малките варианти на DNA не се съобщават за смекчаване на ефекта от замърсяването. Петнадесет наблюдения не отговарят на спецификацията за генна амплификация (медиана на QC за броя на биновете), за да обозначат генна амплификация. За пробите няма да се докладва резултат за генна амплификация.

Проучването е показало, че анализът TSO Comprehensive (EU) се очаква да има ниска поява на кръстосано замърсяване от ямка до ямка или от изпълнение до изпълнение. Тези резултати, заедно с показателите за замърсяване в софтуера, намаляват риска от фалшиви резултати от варианти поради замърсяване на пробата.

Оценка на комплект за извличане на нуклеинова киселина

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

Таблица 43 Характеристики на комплектите

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

Таблица 44 и Таблица 45 обобщават влиянието на комплектите за извличане върху валидността на библиотеката и обозначаването на варианти. Разликата се отчита, средните стойности на комплектите за извличане се различават значително. Средните разлики между комплектите за извличане са изчислени с Комплект 1 като контрола, тъй като Комплект 1 е използван за извличане на повечето нуклеинови киселини, използвани за аналитични изследвания на TSO Comprehensive (EU). Съобщено е, че средната разлика спрямо Комплект 1 показва как различните комплекти за екстракция биха повлияли на другите аналитични проучвания на TSO Comprehensive (EU).

Таблица 44 Въздействия на комплекта за извличане върху валидността на библиотеката

Тип вариант	Library QC Metrics (Измервания на КК на библиотеката)	Средна разлика спрямо Комплект 1
Малки варианти на DNA/TMB	Средно покритие на екзон (брой) PCT Exon 50X (%) Среден размер на въвеждането (bp)	Комплект 2, по-нисък от 56 разчитания Комплект 3 по-висок с 0,298% Комплект 2 и комплект 3 по-ниски с 3 bp
DNA MSI	Използваеми места на MSI	Комплект 3 по-висок с 8 места
Генна амплификация на DNA	Coverage MAD (количество) Медиана на броя на биновете	Комплект 2 по-нисък с 0,0043 Комплект 2 по-нисък с 0,5825, комплект 3 по-висок с 0,3086
(Сливания/сплайс варианти) RNA	Среден размер на въвеждането (bp) Регистър (средна CV Gene500X) Общо за целевите разчитания	Комплект 3 по-висок с 2 bp Комплект 2 по-висок с 0,029 Няма значителна разлика

Наблюдава се, че комплектите за екстракция 2 и 3 имат увеличени поддържащи показания, така че сливанията и сплайс вариантите близо до LoD имат по-голяма вероятност за откриване поради избора на комплект за екстракция.

Таблица 45 Въздействие на комплекта за извличане върху обозначаването на варианти

Вид вариант (единици)	Обозначаване на варианти (Средна разлика спрямо Комплект 1)
Малки DNA варианти (VAF)	Технически незначително Целеви варианти: вариацията между комплектите е малка спрямо остатъчната Нецелеви варианти: Няма значителни разлики за първите два VAF бина. Няма значими разлики, когато се наблюдава статистическа значимост.

Вид вариант (единици)	Обозначаване на варианти (Средна разлика спрямо Комплект 1)
TMB (мутация на мегабаза)	Не е технически значимо, вариацията между комплектите е малка спрямо остатъчната
MSI (% нестабилни места)	Комплект 3, по-нисък от 1,9% нестабилни места
Генна амплификация (промяна в сгъването)	Комплект 2 (0,06) и комплект 3 (0,08) по-висока промяна в сгъването
Сливания (поддържащи разчитания)	Кит 2 имаше 51%, а Кит 3 имаше 23% увеличение на поддържащите разчитания
Сплайс варианти (поддържащи разчитания)	Кит 2 и Кит 3 имаха 48% увеличение на поддържащите разчитания

Смущаващи процеса вещества

Оценено е въздействието на потенциалните ендогенни и екзогенни вещества върху действието на анализа TSO Comprehensive (EU). По време на процеса на извличане на нуклеинови киселини в пробите са добавени ендогенни вещества (меланин и хемоглобин). По време на процеса на извличане на нуклеинова киселина са били налични и екзогенни вещества (етанол, ксилол и протеиназа К), които впоследствие са добавени към пречистената нуклеинова киселина преди приготвянето на библиотеката. Когато се наблюдава интерференция с шипова протеиназа К, се оценяват и повишените концентрации на протеиназа К по време на процеса на екстракция. По време на подготовката на библиотеката са добавени праймери за индекса на излишъка (15% и 30%). Освен индексни праймери са добавени вещества към FFPE проби от мозък, гърда, дебелото черво, бял дроб, медуларна щитовидна жлеза, NSCLC, яйчник, простата, слюнка, кожа, мека тъкан и тиреоидна тъкан – осем проби са извлечени за DNA анализ и 13 са извлечени за RNA анализ. За индексни праймери са използвани шест FFPE проби от три различни вида тъкани (щитовид, пикочен мехур, дебелото черво) за ДНК анализ, а пет FFPE проби от четири различни вида тъкани (бели дробове, щитовидна жлеза, дебелото черво, гърдата) са използвани за РНК анализ. Имало е ендогенна контрола без шипове и буферна или водна екзогенна контрола за всяка от 16-те уникални проби. Влиянието на некрозата е оценено върху различен набор от осем FFPE проби от тъкани на мозък, дебело черво и бял дроб. За всяка проба с некроза има и макродисектирана контрола без некроза. За всички интерференти средства са тествани четири репликати на проба за всяко вещество с анализа TSO Comprehensive (EU) и сравнени със съответната им контрола като състояние за откриване на малки варианти на DNA, генни амплификации, сливания на RNA и RNA сплайс варианти, както и за MSI статус и оценка на TMB. Включени са варианти на CDx и Туморно профилиране.

Откриване на ДНК вариант

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

Откриване на РНК вариант

Данните потвърждават, че меланинът (0,2 µg/ml), етанолът (5%) и ксилолът (0,0001%) не смущават сливанията на RNA или сплайс вариантите. Хемоглобинът (2 mg/ml) пречи (намалява поддържащите разчитания) на три различни сплайс варианта в MET гена. Не е засегнат сплайс вариант в AR гена (три различни проби) и един в гена EGFR (една проба). Ако лабораторията обработва РНК с анализа, тъкан с хемоглобин трябва да се избягва или минимизира при получаване на срезове от тъканния блок.

Протеиназа К (0,04 mg/ml в нуклеинова киселина) пречи на РНК сливания и сплайс варианти. Протеиназа К е тествана при 2,6 mg/ml и 5,2 mg/ml по време на процеса на екстракция, което е 2x и 4x стандартната концентрация в предлаган на пазара комплект. Сливанията се инхибират при 4x, но не и при 2x протеиназа К. Сплайс вариантите се инхибират при 2x протеиназа К. Протеиназа К или еквивалентен ензим не трябва да се увеличават по време на екстракцията от стандартната концентрация, предоставена в комплекта за екстракция.

Вариантите на сплайсовете, поддържащи четенията, намаляват с 30% праймери за индекс на излишък, но не и с 15% излишък.

Некроза

Наличието на некротична тъкан до 70% не смущава оценката на TMB, MSI статуса, малките варианти на ДНК. РНК варианти (подкрепящи разчитания) и гена амплификация (промяна в съгването) е намалено в проби съответно с $\geq 25\%$ и $\geq 23\%$ (по площ) некротично съдържание в тъканната площ. Ако участъците от пробата съдържат повече от 23% некроза в общата площ на тъканта, некротичната тъкан трябва да бъде макродисектирана.

Стабилност

Стабилност в реално време

Стабилността в реално време е използвана, за да се установи срокът на годност на комплекта за анализ TSO Comprehensive (EU), когато се съхранява според условията на етикета. Дизайнът на проучването се основава на тестването на три партиди реагенти и използва класическия дизайн на проучването за стабилност, описан в CLSI EP25-A. Комплектите се съхраняват в окончателна конфигурация на комплект за периода на проучването при условия на съхранение, определени на етикета на продукта.

Замразените компоненти на комплекта се съхраняват при -15°C до -25°C . Охладените компоненти на комплекта се съхраняват при 2°C до 8°C .

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

Стабилност на комплекта при употреба

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

Стабилност на нуклеиновата киселина

Стабилността на нуклеиновите киселини (DNA и RNA) и свързаната с тях количествено определяне за използване с анализа TSO Comprehensive (EU) е оценена с помощта на FFPE проби от множество типове тъкани. Блокчетата FFPE са разделени и всички нуклеинови киселини са екстрахирани наведнъж. Екстрахираната нуклеинова киселина беше старателно смесена, количествено определена, проверена за качество на нуклеиновата киселина и разделена на два комплекта епруветки за еднократна употреба, които да бъдат замразени за две времеви точки: T0 контрол (базово ниво) и T1 тест (≥ 28 дни). Цялата екстрахирана RNA се съхранява при -85°C до -65°C и цялата извлечена DNA се съхранява при -25°C до -15°C за посочените периоди от време и след това се обработва чрез TSO Comprehensive (EU) анализа в множество репликати и оператори. Състоянието на теста T1 е сравнено с контролата за MSI статус, TMB резултат, генни амплификации, малки варианти на DNA, сливания на RNA и сплайс варианти на RNA. Данните показват, че нуклеиновите киселини и свързаното с тях количествено определяне за използване с TSO Comprehensive (EU) анализа са стабилни до 28 дни, когато се съхраняват при препоръчителните температури (RNA при -85°C до -65°C и DNA при -25°C до -15°C).

Стабилност на библиотека

Стабилността на библиотеките, използващи всяка от шестте безопасни точки за спиране за анализа (вижте Таблица 5), е оценена с помощта на FFPE проби от множество типове тъкани. Контролните библиотеки (T0, без точки за спиране) са секвенирани веднага в края на работния процес. Аликвоти от същите библиотеки са задържани в точките за спиране при -25°C до -15°C за времето (T1) в потвърждение на дните, изброени в Таблица 5. T1 е сравнен с T0 за малки ДНК варианти, TMB, генни амплификации, MSI, PNH сливания и PNH сплайс варианти с CDx и туморни профили. Данните показват, че генерираните от TSO Comprehensive (EU) анализа библиотеки са стабилни в съответствие с инструкциите за употреба.

Стабилност на FFPE тъкани върху предметно стъкло

Стабилността на FFPE тъканите върху предметно стъкло за употреба с анализа TSO Comprehensive (EU) е оценена чрез разрязване на FFPE блокове (5 µm сегменти) от различни уникални проби върху предметни стъкла, последвано от съхраняване при стайна температура (22°C) в 2 времеви точки. РНК се екстрахира и съхранява при -65°C до -85°C, а ДНК се екстрахира и съхранява при -15°C до -25°C за по-малко от 1 седмица преди тестването. Материалът на нуклеиновата киселина се определя количествено и след това се обработва чрез анализа TSO Comprehensive (EU) в рамките на 24 часа за всяка времева точка. Във всяка времева точка множество реплики и оператори на проба са тествани с анализа TSO Comprehensive (EU) и сравнени с T0 времева точка за MSI, TMB, генни амплификации, малки варианти на ДНК, сливания на РНК и сплайс варианти на РНК, включително CDx и туморни профили. Обозначаването на варианта е оценено и отговаря на всички критерии за приемане, което показва, че FFPE тъканите, монтирани на предметно стъкло за използване с анализа TSO Comprehensive (EU), са стабилни при стайна температура за до 4 седмици (28 дни). Отбелязва се, че 10% намаление на степента на валидност на MSI библиотеката QC е установено след 4 седмици (28 дни) поради комбинация от време на оператора и съхранение. РНК сливанията и сплайс вариантите имат приблизително 29% намаление в поддържащите разчитания след съхранение на предметни стъкла в продължение на 4 седмици (28 дни).

Защитна лента при входящо титруване на нуклеинови киселини

Входящите нуклеинови киселини за анализа TSO Comprehensive (EU) са оценени чрез тестване на DNA от 33 FFPE проби, обхващащи 17 вида тъкани, при входящи нива в диапазона от 10 ng до 500 ng, и тестване на RNA от 5 FFPE проби от 5 типа тъкани при входящи нива в диапазона от 10 ng до 85 ng. Бяха оценени показателите за КК на библиотеките и бяха зависими от пробите. Резултатите за DNA показват, че някои, но не всички показатели за КК на DNA пробите реагират на увеличени входни данни над номиналните стойности от 40 ng:

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

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

Граница на празна проба

Процентът на фалшиво положителните резултати (от общия брой очаквани отрицателни резултати) е оценен чрез репликатно тестване на FFPE нормална или доброкачествена съседна тъкан, която не трябва да съдържа соматични варианти за малки варианти на DNA, генни амплификации, MSI, сливания на PНК и PНК сплайс варианти. Фалшиво положителните резултати не са анализирани за TMB, тъй като няма клинична граница. Шест DNA и 6 RNA FFPE проби бяха пуснати в два екземпляра с 2 оператора в продължение на 3 дни за всяка от 2-те партии реагенти. Подгрупа от проби беше повторно обединена и повторно секвенирана само в 3x DNA и само в 3x RNA формат за оценка на фалшиво положителни резултати с няколко мултиплексни конфигурации, поддържани от това устройство. Освен това имаше 30 допълнителни проби от RNA, извършени в два екземпляра, които бяха обработени с 1 партида реагент, разделена между 2 оператора. Общо имаше 168 възможни наблюдения за DNA и 228 наблюдения за RNA, намалени от невалидни библиотеки за всеки тип вариант. Процентът на фалшиво положителните резултати е изчислен на генно ниво за амплификации и на ниво позиция (приблизително 1,9 милиона позиции) за малки варианти на DNA. Процентът на фалшивите положителни за типовете варианти на ДНК е показан в [Таблица 46](#). TSO Comprehensive (EU) няма претенции за CDx (Ниво 1) за малки варианти на ДНК, така че не могат да се докладват фалшиви положителни варианти на малки ДНК за Ниво 1. 271-те фалшиви положителни резултата са изравнени от TSO Comprehensive (EU) базата знания. Не са клинично значими фалшиви положителни резултати (ниво 2). Има 4 фалшиви положителни резултата в ниво 3, произтичащи от 2 варианта в 4 (2,4%) наблюдения от 168 наблюдения. Процентът фалшиво положителните за RNA сливане и сплайс варианти е 0%, както е показано в [Таблица 47](#).

Таблица 46 Фалшиво положителни според тип вариант на ДНК

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

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

Таблица 47 Фалшиво положителни според тип вариант на RNA

Тип вариант	Фалшиво положителни резултати
Сливане	0% (0/227)
Сплайс вариант	0% (0/227)

Граница на откриване

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

Проучване 1

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

За варианти на DNA двете партиди бяха анализирани независимо с помощта на пробит регресия или подход за скорост на попадане (най-ниско ниво на тест с честота на попадане (оценка на точки) $\geq 95\%$), за да се определи LoD за всеки вариант по партида. По-голямата LoD в двете партиди реагенти беше приета като граница на откриване за варианта ([Таблица 48](#)).

За сливания на RNA бяха използвани FFPE клетъчни линии за оценка на стойностите на LoD за всеки слят ген. След това LoDs бяха проверени с FFPE тъкани, като се използваха дублирани библиотечни препарати за 3 оператора, 3 инструмента и 3 партиди реагенти, за да се генерират 54 наблюдения на вариант в близост до LoD, установена с FFPE клетъчни линии. Заявените граници на откриване за всяко сливане ([Таблица 49](#)) са най-ниските средни поддържащи разчитания, които са достигнали честота на попадане (точкова оценка) $\geq 95\%$.

Таблица 48 Граница на откриване за малки варианти на DNA NTRK1, NTRK3 и RET

Маркер	Chr ¹	Position (Позиция)	Референция	Алтернатива	Граница на откриване (Вариантна алелна честота)
NTRK1 G595R (SNV) ²	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV) ²	Chr15	88476283	A	G	0,032

Маркер	Chr ¹	Position (Позиция)	Референция	Алтернатива	Граница на откриване (Вариантна алелна честота)
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 (делеция) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = Хромозома

² Тези варианти на ДНК са анализирани чрез пробит регресия; другите варианти на ДНК са анализирани чрез подхода за скорост на попадане.

Таблица 49 Граница на откриване за NTRK и RET сливания

Ген	Сливане	Граница на откриване (Поддържащи разчитания)
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

Проучване 2

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

DNA варианти

LoDs на 10 класа малки варианти на DNA (общо 25 варианта) и 2 амплификации на DNA ген (ERBB2 и MET) бяха определени и обобщени като диапазони ([Таблица 50](#)). Включени са и варианти на RET от LoD за Проучване 1. Две от 3 инсерции, по-големи от 5 bp, имаха LoD от 0,034 и 0,036 VAF, като третата имаше LoD от 0,215 VAF. Последната беше инсерция в регион с ниска сложност, където инсерцията добавя допълнителни повторения, въздейства на подравняването и изисква повече разчитания за последователно откриване. Следователно, някои геномни контексти с ниска сложност биха могли да повлияят на откриването на инсерции > 5 bp.

Таблица 50 Граница на откриване за малки варианти на DNA и генни амплификации

Тип (мерна единица за LoD)	Вариант клас / Геномен контекст	Брой варианти	Диапазон (VAF)
Малки ДНК варианти (алелна честота на вариант)	SNV	5	0,016 – 0,064
	MNV	3	0,022 – 0,048
	Инсерция (1–2 bp) близо до хомополимерни повторения	2	0,086 – 0,104
	Инсерция (1–2 bp) близо до динуклеотидни повторения	2	0,038 – 0,051
	Инсерция (3–5 bp)	2	0,030 – 0,056
	Инсерция (> 5 bp и до 25 bp)	3	0,034 – 0,215
	Делеция (1–2 bp) близо до хомополимерни повторения	2	0,094 – 0,100
	Делеция (1–2 bp) близо до динуклеотидни повторения	2	0,033 – 0,070
	Делеция (3–5 bp)	2	0,028 – 0,064
Делеция (> 5 и до 25 bp)	2	0,047 – 0,055	
Генна амплификация (промяна в сгъването)	По ген (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Анализ на нецелели варианти е извършен от проби от Проучване 1, които имат най-малко пет нива на тестване. Всеки нецелели вариант е анализиран индивидуално и LoD се оценява само за варианти с поне едно ниво > 0% и ≤ 95% скорост на попадане и поне едно ниво ≥ 95% скорост на попадане. [Таблица 51](#) показва персентилите заедно с минималните и максималните LoD, наблюдавани по клас за нецелелите варианти. Нецелелите варианти предоставят повече варианти по клас, отколкото са тествани в Проучване 2 и са в съответствие с диапазоните на LoD от [Таблица 50](#).

Таблица 51 Обобщена статистика за границите на откриване по клас на нецелеви варианти (от Проучване 1)

Клас	N	Мин	25%	50%	75%	90%	Макс.
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
Инсерция	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Делеция	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Сливания

LoD са определени за 19 сливания, което представлява 20 гена в TSO Comprehensive (EU) панела, които варираха от 9 до 31,3 поддържащи разчитания (Таблица 52). Допълнителни 3 гена (NTRK1–3) са тествани в другото проучване. Генът RET е тестван както тук, така и в другото проучване. Шестнадесет сливания с определени LoD имаха данни, съответстващи на обща LoD от 16 поддържащи разчитания, използвайки двустранна, 95% горна граница на доверие (UCL). Две сливания имаха LoD от 24,7 и 31,3 поддържащи разчитания, които не бяха в съответствие с общата LoD.

Сливането FGFR2-SRPK2 със стойност на LoD от 24,7 поддържащи разчитания имаше повтарящи се припокриващи се региони в точката на прекъсване, както е посочено от софтуера за анализ TSO Comprehensive (EU). Повтарящите се региони в рамките на точка на прекъсване обикновено имат пониски нива на доказателства, тъй като разчитанията биха могли да се картографират другаде в генома или да останат неподравнени. Освен това повтарящите се региони правят процеса на сглобяване (използван за идентифициране на фузионни секвенции) по-предизвикателен и изискват допълнителни доказателства за конструиране на правилната секвенция. SEPT14-EGFR е друг пример за сливане с хомоложна секвенция в точката на прекъсване.

Сливането BCL2-IGHJ5 със стойност на LoD от 31,3 поддържащи разчитания имаше много къс ген (IGHJ5) с точката на прекъсване близо до началото на екзон, изискващ къси подравнявания с пропуски. Следователно, са необходими още разчитания за последователно откриване.

Таблица 52 Граница на откриване за сливания

Сливане	Ген А точка на прекъсване	Ген Б точка на прекъсване	LoD	Обща LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	да
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	да
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	да
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	да
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	да
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	да
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	да

Сливане	Ген А точка на прекъсване	Ген Б точка на прекъсване	LoD	Обща LoD
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	да
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	да
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	да
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	не
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	да
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	да
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	да
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	да
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	да
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	да
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	не
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	да

Сплайс варианти

Двата PTK сплайс варианта – MET и EGFR – имат поддържащи разчитания за LoD съответно 18,7 и 16,7.

Туморно съдържание

Резултатите в проучването се използват за изготвяне на препоръки за туморно съдържание в клинични проби. В общия случай колкото по-голямо е туморното съдържание, толкова по-висок е „сигналът“ (VAF, промяна в пъти или поддържащи разчитания) за варианти в тумора. Препоръките за минимално туморно съдържание се основават на следните наблюдения. Стойностите на LoD за малките варианти на DNA не надвишават 0,104 VAF (с изключение на инсерцията в TP53). За откриване на подхранващи мутации в тумора (с честота на вариантите алели 0,50) се препоръчва 20% туморно съдържание, така че тези мутации да имат 0,10 VAF и да са на или над LoD. При 20% туморно съдържание гените, амплифицирани до промяна от 5,5 пъти (11 копия), ще бъдат последователно открити въз основа на граница на откриване с промяна от 1,8 пъти. При 20% туморно съдържание сливанията със 74 поддържащи разчитания ще бъдат последователно открити въз основа на граница на откриване от 14,7 поддържащи разчитания.

Възпроизводимост

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

Проучване 1

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

Процентът положителни обозначавания (PPC) и процентът отрицателни обозначавания (PNC) за целеви малки варианти на ДНК и целеви варианти на РНК сливане на високо ниво бяха определени като първични крайни точки. PPC и PNC за целеви малки варианти на ДНК и целеви варианти на сливане на РНК на ниско ниво бяха изчислени като вторични крайни точки. Двустранните 95% доверителни интервали (CI), свързани с всички крайни точки, са изчислени по метода за оценка на Уилсън. Първичните анализи са извършени, за да се оценят PPC и PNC (със съответните 95% CI) при целевите членове на панела на високо ниво чрез комбиниране на наблюденията на анализа TSO Comprehensive (EU) за дадена цел в група от членове на панела, представляващи приложимия клас варианти (например малки варианти на DNA и RNA сливания) с различни обекти/инструменти, оператори и процедури. За всеки целеви вариант наблюденията от анализа TSO Comprehensive (EU) при други членове на панела на високо ниво, насочени към същия тип вариант, но несъдържащ същия вариант, както е определено от правилото за мнозинство, бяха комбинирани към изчисления PNC. Общите PPC и PNC за целевите членове на панели на ниско ниво бяха определени по подобен начин.

RET малки варианти на ДНК

За членовете на панела с малки варианти на ДНК на високо ниво, общата PPC е 100,0% (207/207; 95% CI: 98,2% до 100,0%) ([Таблица 53](#)). За членовете на панела с малки варианти на ДНК на високо ниво, общият PNC е 100,0% (1035/1035; 95% CI: 99,6% до 100,0%) ([Таблица 54](#)). За целеви членове на панела с малки варианти на ДНК на ниско ниво, общата PPC за целевите членове на панела с малки варианти на ДНК на ниско ниво е 99,1% (210/212; 95% CI: 96,6% до 99,7%), а общият PNC е 100,0% (1026/1026; 95% CI: 99,6% до 100,0%).

Таблица 53 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на RET малки варианти на ДНК в целеви членове на панела от високо и ниско ниво

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотид)	Целеви вариант (аминокиселина)	N	Средна VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% ДИ ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_АТ	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Делеция	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Инсерция	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Всички малки ДНК варианти с висока	Всички малки ДНК варианти с висока	Всички малки ДНК варианти с висока	207	N/A ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_АТ	RET C634Y	36	0,071	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Делеция	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Инсерция	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Всички малки ДНК вариантите са ниски	Всички малки ДНК вариантите са ниски	Всички малки ДНК вариантите са ниски	212	N/A ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Съкращения: N/A, неприложимо; VAF, честота на вариант на алела.

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

Таблица 54 PNC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на RET малки варианти на ДНК в целеви членове на панела от високо и ниско ниво

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотид)	Целеви вариант (аминокиселина)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% ДИ ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Делеция	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Инсерция	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Всички малки ДНК варианти с висока	Всички малки ДНК варианти с висока	Всички малки ДНК варианти с висока	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Делеция	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Инсерция	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Всички малки ДНК вариантите са ниски	Всички малки ДНК вариантите са ниски	Всички малки ДНК вариантите са ниски	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

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

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

Таблица 55 показва анализа на компонентите на дисперсията на честотите на вариантите на алелите (VAF) в приблизително 36 наблюдения за всеки член на панела. Стандартното отклонение (SD) и процентният коефициент на вариация (% CV; общо и за всеки източник) бяха изчислени и представени за всеки целеви RET малък вариант на ДНК.

Таблица 55 TSO Comprehensive (EU) Анализ на компонентите на дисперсия чрез анализ на VAF при целеви членове на панела за малки варианти на ДНК

Ниво на вариант	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотид)	Целеви вариант (аминокиселинен)	N	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на ден	SD (%CV) на репликат	Общо SD (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Делеция	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (5,5)	0,017 (8,6)	0,020 (10,2)
	Инсерция	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,6)	0,010 (10,1)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (22,2)	0,009 (22,2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0)	0,003 (9,8)	0,002 (6,2)	0,007 (21,7)	0,008 (24,6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,008 (17,5)	0,008 (18,5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0)	0,008 (10,7)	0,000 (0,0)	0,011 (14,9)	0,013 (18,4)
	Делеция	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)
	Инсерция	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8)	0,000 (0,0)	0,003 (9,1)	0,006 (15,9)	0,008 (22,9)

NTRK 1–3 и RET сливания

За членовете на панела със сливане на RNA на високо ниво общата PPC е 99,3% (285/287; 95% CI: 97,5% до 99,8%) (Таблица 56). PPC е 100% за всеки член на панела на високо ниво, с изключение на члена на панела BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; 95% CI: 81,9% до 98,5%]). Общият PNC за членовете на панела за сливане на RNA на високо ниво е 100,0% (1724/1724; 95% CI: 99,8% до 100,0%) (Таблица 57). За целевите членове на панела за сливане на RNA на ниско ниво общата PPC е 95,4% (272/285; 95% CI: 92,3%, 97,3%), а общият PNC е 100,0% (1851/1851; 95% CI: 99,8% до 100,0%).

Таблица 56 PPC на TSO Comprehensive (EU) анализа за откриване на NTRK и RET сливания при целеви членове на панел на високо и ниско ниво

Ниво на вариант	Целево сливане	N	Средна стойност на поддържащи разчитания	PPC (%) (n/N)	95% CI*
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0%)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Най-висока стойност на сливанията	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)

Ниво на вариант	Целево сливане	N	Средна стойност на поддържащи разчитания	PPC (%) (n/N)	95% CI*
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 (29/36)	(65,0, 90,2)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 (33/34)	(85,1, 99,5)
	Най-ниска стойност на сливанията	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

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

Таблица 57 PNC на TSO Comprehensive (EU) анализа за откриване на NTRK и RET сливания при нецелев членове на панел на високо и ниско ниво

Ниво на вариант	Целеви сливания	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% ДИ ²
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Най-висока стойност на сливанията	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)

Ниво на вариант	Целеви сливания	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% ДИ ²
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Най-ниска стойност на сливанията	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

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

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

Таблица 58 е показан анализът на компонентите на дисперсията на поддържащите разчитания в приблизително 36 наблюдения в рамките на всяко целево сливане. SD и %CV (общо и за всеки източник) са изчислени и представени за всяко целево сливане.

Таблица 58 TSO Comprehensive (EU) Анализ на компонентите на дисперсия чрез анализ на поддържащите разчитания в целевите членове на панел за сливане на РНК

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

Проучване 2

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

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

LoD е концентрацията на анализа, при която наблюдаваните резултати от анализа са „положителни“ (открит вариант спрямо граничната стойност на анализа TSO Comprehensive (EU)) $\geq 95\%$ от времето. Средните нива на наблюдаваните варианти са групирани в следните категории: приблизително $<2 \times \text{LoD}$ (нива на наблюдаваните варианти при $<1,5 \times \text{LoD}$), $\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$ (нива на наблюдаваните варианти между $1,5 \times \text{LoD}$ и $3,4 \times \text{LoD}$) и приблизително $>3 \times \text{LoD}$ (нива на наблюдаваните варианти при $>3,4 \times \text{LoD}$).

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

Малки DNA варианти

Таблица 59 показва PPC за целевите малки варианти на DNA. PPC варират от $91,3\%$ за BRAF SNV до 100% за повечето малки варианти на DNA.

Таблица 59 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на малки варианти на ДНК при целеви членове на комбиниран панел

Наблюдавано ниво на вариант ¹	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотид)	Целеви вариант (аминокиселина)	Средна VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% ДИ ³
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ДЕЛЕЦИЯ	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ДЕЛЕЦИЯ	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ИНСЕРЦИЯ	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ИНСЕРЦИЯ	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
$< 2 \times \text{LoD}$	ИНСЕРЦИЯ	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)

Наблюдавано ниво на вариант ¹	Тип вариант	Целеви вариант (нуклеотид)	Целеви вариант (аминокиселина)	Средна VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% ДИ ³
~2-3x LoD	ДЕЛЕЦИЯ	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	ДЕЛЕЦИЯ	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	ИНСЕРЦИЯ	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_ AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	ИНСЕРЦИЯ	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ДЕЛЕЦИЯ	chr10_89720798_ GТАCT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	ИНСЕРЦИЯ	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	ИНСЕРЦИЯ	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

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

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

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

PNC е 100% за всички малки варианти на DNA.

Таблица 60 е показан анализът на компонентите на дисперсия на резултатите от честотата на вариантите алели (VAF) за всеки източник на вариация и общата вариация при всички целеви членове на панела с малки варианти на DNA.

Таблица 60 Анализ на компонентите на дисперсия на VAF за целеви малки варианти на DNA

Целеви вариант (нуклеотид)	N	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_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)

Имало е два малки целеви DNA варианта, за които броят на наблюденията е твърде малък, за да бъде приложен моделът на компонентите на дисперсията. За тези два целеви варианта общите SD са 0,027 за вариант chr1_27024001_C_CG и 0,001 за вариант chr17_7578470_C_CGGCGG.

Генни амплификации

Таблица 61 са показани PPC за целеви генни амплификации. PPC са 100,0% за MET и 100,0% за ERBB2.

Таблица 61 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на генни амплификации в целеви членове на комбиниран панел

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

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

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

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

PNC са 100% за всички генни амплификации.

В Таблица 62 е показан анализът на компонентите на дисперсия на резултатите от промените в пъти за всеки източник на вариация и общата вариация при всички членове на панела с целеви генни амплификации.

Таблица 62 Анализ на промяната в пъти в компонентите на дисперсия за целеви генни амплификации

Целеви вариант	N	Средна промяна в пъти	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Таблица 63 показва PPC за целеви членове на MSI-High панел. PPC е 100% и за двамата членове на MSI-High панела.

Таблица 63 PPC на TSO Comprehensive (EU) анализ за откриване на MSI-High статус при целеви членове на комбиниран панел

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

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

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

Таблица 64 е показан анализът на компонентите на дисперсия за оценките на MSI за всеки източник на вариация и общата вариация при всички членове на панела, обект на анализ за MSI-High статус.

Таблица 64 Анализ на компонентите на дисперсия на оценката на MSI за целеви членове на MSI-High панел

Член на панел	N	Средна оценка на MSI	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

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

Таблица 65 е показан анализът на компонентите на дисперсия за резултатите за TMB при всеки източник на вариация и общата вариация при членовете на панела за TMB. Общите стандартни отклонения (SD) на оценката на TMB са 1,0 (%CV = 13) за един член на панела (средна оценка на TMB = 7,6) и 1,1 (%CV = 2) за друг член на панела (средна оценка на TMB = 63,2).

Таблица 65 Анализ на компонентите на дисперсия за оценка на TMB резултата при целеви членове на TMB панел

Член на панел*	N	Средна оценка TMB	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

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

РНК варианти

Таблица 66 показва PPC за целевите РНК варианти. PPC варира от 91,7% за KIF5B-RET до 100% за повечето RNA варианти.

Таблица 66 PPC на анализа TSO Comprehensive (EU) за откриване на РНК варианти при целеви членове на комбиниран панел

Наблюдавано ниво на вариант ¹	Тип вариант	Целеви вариант	Средна стойност на поддържащите разчитания ²	PPC (%) (n/N)	95% ДИ ³
> 3x LoD	Сливане	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Сливане	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Сливане	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Сливане	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Сливане	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Сливане	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Сливане	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	Сливане	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Сливане	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Сливане	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Сливане	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Сливане	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Сливане	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Сливане	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	Сливане	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)
	Сливане	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
> 3x LoD	Сливане	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Сплайс вариант	EGFR VIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	Сплайс вариант	Пропускане на MET екзон 14	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

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

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

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

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

Таблица 67 е показан анализът на компонентите на дисперсия на резултатите от поддържащите разчитания за всеки източник на вариация и общата вариация при всички членове на панела с целеви RNA варианти.

Таблица 67 Анализ на компонентите на дисперсия на поддържащите разчитания за целеви RNA варианти

Целеви вариант	N	Средна стойност на поддържащи разчитания	SD (%CV) на мястото	SD (%CV) на оператор (място)	SD (%CV) на ден (място, оператор)	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на изпълняване	Общо SD (%CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR VIII сплайс вариант	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Сплайс вариант с пропускане на MET екзон 14	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Вътрешнолабораторна прецизност

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

Проучване 1

Вътрешнолабораторната прецизност е оценена за сливания на NTRK1–3 (глиом от по-нисък клас, мултиформен глиобластом, миофибробластен сарком, секреторен карцином на гърдата), сливания на RET (рак на щитовидната жлеза и кожна тъкан от неизвестен рак) и малки варианти на DNA на RET (медуларен рак на щитовидната жлеза) с FFPE тъкани от посочените видове рак. Всяка проба е тествана

на две нива на варианта: ~1x LoD (ниско ниво на вариант) и ~2–3x LoD (високо ниво на вариант), с изключение на пробата, съдържаща CCDC6-RET, която е тествана само на ниско ниво на вариант. Всяка от пробите на всяко тествано ниво е изпълнена в две копия при всяко събитие за приготвяне на библиотека от трима (3) оператори. Всеки оператор започва приготвянето на библиотеката в три (3) непоследователни начални дни и секвенира на три (3) определени NextSeq 550Dхинструмента. Тествани са три (3) партиди с реагенти, което доведе до 54 наблюдения на ниво. На някои нива са направени по-малко от 54 наблюдения поради невалидни библиотеки.

Качествен анализ

Качествената съгласуваност на обозначаването на варианти е оценена поотделно за двете нива на варианти за даден вариант от обединени наблюдения по отношение на всички променливи (оператори, партиди с реагенти, инструменти, дни и репликати). Процентът положителни обозначавания (PPC, percent positive calls) и процентът отрицателни обозначавания (PNC, percent negative calls) и свързаният с тях двустранен 95% доверителен интервал (оценка на Уилсън) са обобщени в [Таблица 68](#) (малки ДНК варианти) и [Таблица 69](#) (РНК сливания).

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

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

Таблица 68 Качествени резултати за целевите ДНК варианти

Ниво на вариант	Вариант	Тип вариант	Средна стойност на VAF	PPC (%) (n/N) (95% ДИ)	PNC (%) (n/N) (95% ДИ)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3 – 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	ДЕЛЕЦИЯ	0,048	87,0 (47/54) (75,6 – 93,6)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET C618R	SNV	0,045	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET M918T	SNV	0,042	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	100,0 (216/216) (98,3, 100,0)
	RET D631_L633delinsE*	ДЕЛЕЦИЯ	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Ниво на вариант	Вариант	Тип вариант	Средна стойност на VAF	PPC (%) (n/N) (95% ДИ)	PNC (%) (n/N) (95% ДИ)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	ДЕЛЕЦИЯ	0,088	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET C618R	SNV	0,146	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET M918	SNV	0,078	100,0 (52/52) (93,1, 100,0)	100,0 (194/194) (98,1, 100,0)
	RET D631_ L633delinsE*	ДЕЛЕЦИЯ	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

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

Таблица 69 Качествени резултати за целевите РНК сливания

Ниво на вариант	Сливане	Средна стойност на поддържащи разчитания	PPC (%) (n/N) (95% ДИ)	PNC (%) (n/N) (95% ДИ)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE клетъчна линия)	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 (проба 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (проба 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Ниво на вариант	Сливане	Средна стойност на поддържащи разчитания	PPC (%) (n/N) (95% ДИ)	PNC (%) (n/N) (95% ДИ)
~2-3xLOD	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 клетъчна линия)	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	Не е приложимо	Не е тествано	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (проба 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (проба 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Количествен анализ

Извършен е анализ на компонентите на дисперсия с ограничена максимална вероятност (REML, Restricted maximum likelihood), за да се оцени общата вариация на основната непрекъсната променлива (VAF за малки варианти на ДНК и поддържащи разчитания за сливания на РНК) и да се оценят компонентите на прецизността [стандартно отклонение (SD, standard deviation), коефициент на вариация (CV, coefficient of variation)] за всеки източник на вариация [оператори, инструменти, дни, партии с реагенти, остатъчна и обща вариация]. Резултатите са представени в [Таблица 70](#) за малките варианти на ДНК и [Таблица 71](#) за РНК сливанията.

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

Таблица 70 Количествени резултати за SD и CV за целевите малки варианти на ДНК

Ниво на VAF	Вариант	Тип вариант	Брой валидни опити	Средна стойност на VAF	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	ДЕЛЕЦИЯ	54	0,048	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,004 (8,7)	0,014 (30,0)	0,015 (31,2)
	RET C618R	SNV	54	0,046	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,014 (31,3)	0,014 (31,3)
	RET M918T	SNV	53	0,042	0,000 (0,0)	0,001 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (25,6)	0,011 (25,7)
	RET C634Y	MNV	54	0,028	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (3,3)	0,000 (0,0)	0,009 (30,7)	0,009 (30,9)
	RET D631_L633delinsE	ДЕЛЕЦИЯ	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
~3x LoD	RET D898_E901del	ДЕЛЕЦИЯ	54	0,088	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,001 (1,4)	0,006 (7,0)	0,017 (19,2)	0,018 (20,5)
	RET C618R	SNV	54	0,146	0,003 (1,7)	0,000 (0,0)	0,020 (13,7)	0,002 (1,1)	0,018 (12,6)	0,027 (18,7)
	RET M918T	SNV	52	0,078	0,002 (3,1)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,007 (9,1)	0,018 (23,1)	0,020 (25,0)
	RET C634Y	MNV	54	0,095	0,000 (0,0)	0,002 (2,5)	0,002 (2,1)	0,000 (0,0)	0,014 (15,0)	0,015 (15,3)
	RET D631_L633delinsE	ДЕЛЕЦИЯ	52	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

Таблица 71 Количествени резултати за SD и CV за целевите сливания на РНК

Ниво на подкрепящите разчитания	Сливане	Брой валидни опити	Средна стойност на поддържащи разчитания	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (клетъчна линия)	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 (Проба 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (Проба 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Ниво на подкрепящите разчитания	Сливане	Брой валидни опити	Средна стойност на поддържащи разчитания	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо SD (%CV)
2-3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (клетъчна линия)	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 (Проба 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
KIF5B-RET (Проба 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)	

Проучване 2

Вътрешно-лабораторната прецизност е оценена за TMB и MSI. Пет NSCLC FFPE ДНК проби за TMB и седем CRC FFPE проби за MSI, включващи както MS-стабилни проби (MSI-Stable), така и такива с високи MSI (MSI-High), са използвани за оценка на прецизността на различни нива в диапазона на резултатите. Всяка от пробите е изпълнена в две копия от три (3) оператора, в три (3) дни, с три (3) подготовки на библиотеки за три (3) партиди с реагенти, като са използвани три NextSeq 550Dхинструмента, генериращи 54 наблюдения на ниво.

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

Общата вариация на оценките на TMB и MSI, заедно с ролята на изходните променливи (инструменти, оператори, партиди, дни и остатъчна вариация), е количествено определена с помощта на модел на компонентите на дисперсия в обхвата на резултатите. Стандартното отклонение (SD) и коефициентът на вариация (CV) са представени в Таблица 72 за TMB и Таблица 73 за MSI по нива. На някои нива са направени по-малко от 54 наблюдения поради невалидни библиотеки.

Таблица 72 Количествена оценка на TMB с резултати за SD и CV

Ниво	Средна оценка TMB	Брой валидни опити	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD на партида (%CV)	SD за деня (%CV)	Остатъчно SD (%CV)	Общо стандартно отклонение (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)

Ниво	Средна оценка TMB	Брой валидни опити	SD (%CV) на оператор	SD (%CV) на инструмент	SD на партида (%CV)	SD за деня (%CV)	Остатъчно SD (%CV)	Общо стандартно отклонение (%CV)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

Таблица 73 Количествена оценка на MSI с резултати за SD и CV

MSI статус	Ниво	Средна оценка на MSI (%)	Брой валидни опити	SD на оператора (%CV)	SD (%CV) на инструмент	SD (%CV) на партида	SD (%CV) на ден	Остатъчно SD (%CV)	Общо стандартно отклонение (%CV)
MS-стабилни	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
Високи MSI	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

Вариациите в оценката на TMB обикновено нараства средно аритметично, както се очаква от теоретичните разпределения на числени данни. Вариациите в оценката на MSI за нива, близки до оценка за MSI = 50, са по-големи от вариациите в оценката на MSI, по-близки до 0 или 100, в съответствие с вариабилността от теоретичните разпределения на пропорционални данни. Остатъчният компонент остава с най-голям принос към общата дисперсия за оценка както на MSI, така и на TMB, което потвърждава заключението, че резултатите са независими от оператори, партиди, инструменти и дни. Въпреки това, MSI и TMB са сложни биомаркери и аналитичната ефективност би могла да варира от проба до проба. Това означава, че вариацията на TMB зависи не само от стойността на TMB, но и от състава на вариантите в пробата, като например тип на варианта (SNV, Indel) и ниво на VAF (близост до границата на включване). По същия начин вариацията на MSI зависи не само от стойността на MSI, но и от състава на местата в пробата, като например броя на местата, които са нестабилни, и количественото измерение на нестабилността на всяко място.

Стойностите C5 и C95 около границата от 20,00% са определени за MSI чрез профил на прецизност (Таблица 74).

Таблица 74 Интервали C5-C95 за MSI

Оценка	C5	C95
MSI	17,17%	23,32%

Оценено е влиянието на туморното съдържание върху оценките на TMB и MSI. При повечето проби туморно съдържание $\geq 30\%$ има незначително въздействие върху оценките на TMB над приблизително 10 мутации на мегабаза. Оценките на TMB остават относително непроменени с увеличаване на туморното съдържание. При проби с висока MSI туморното съдържание показва положителна, линейна

корелация с оценката на MSI. Пробите с висока MSI обикновено остават MSI-H, когато туморното съдържание е $\geq 30\%$. Пробите от ендометриум се държат отчетливо различно от другите типове тъкани и е установено, че се нуждаят от по-голямо количество туморно съдържание, за да бъдат наречени с висока MSI.

Точност на профилиране на тумори

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

Откриване на малък вариант на ДНК

Откриването на малки варианти на ДНК чрез TSO Comprehensive (EU) анализа беше сравнено с резултатите от секвениране на целия екзом (WES), което използва WES със съвпадащи туморни нормални двойки проби за обозначаване на герминативна линия и соматичен малък вариант. Сравнението между малки варианти, състоящи се от еднонуклеотидни варианти (SNV), инсерции и делеции, се основава на 124 проби от 14 различни типа тъкани, които са валидни както за TSO Comprehensive (EU), така и за WES. TSO Comprehensive (EU), но не WES анализът може да открие многонуклеотидни варианти (MNVs, 2 – 3 bp), което изисква фазиране. TSO Comprehensive (EU) MNV бяха оценени като индивидуални SNV спрямо WES. Резюме на съгласуваността на ниво вариант, включително положително процентно съответствие (PPA) и отрицателно процентно съответствие (NPA) за всички обозначавания на варианти, е показано в [Таблица 75](#).

Таблица 75 Резюме на съгласуваността за обозначавания на малки варианти, оценени по състояние на герминативна линия или соматично състояние

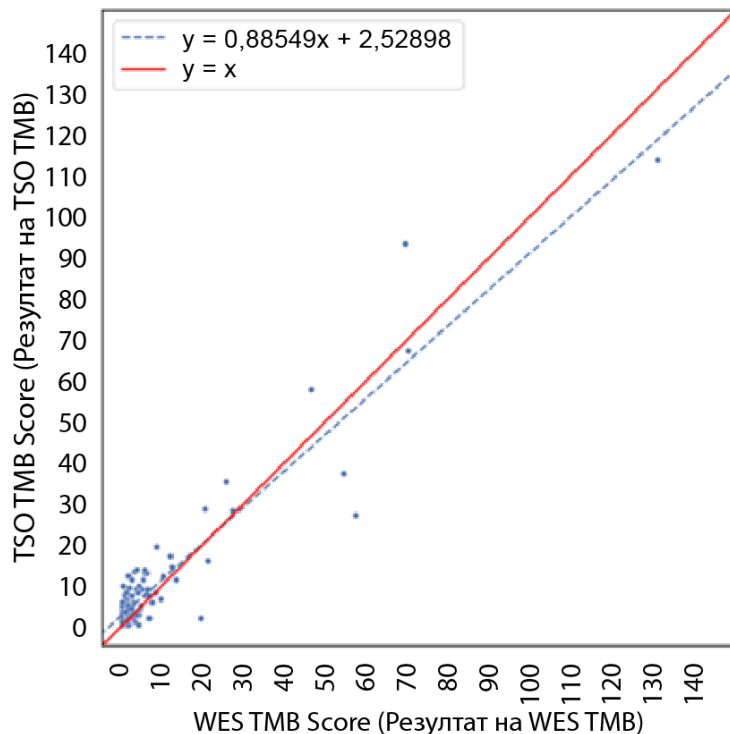
	Обозначен соматичен WES	Обозначена герминативна линия на WES	Необозначен WES
TSO Comprehensive (EU) Обозначен	382	33 163	426
TSO Comprehensive (EU) Необозначен	69	61	70 000 481
Общо	451	33 224	70 000 907
Процентно съответствие	PPA: 85% (382/451), 95% CI: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33 163/33 224) 95% ДИ: [99,8%, 99,9%]	NPA: > 99% (70 000 481/70 000 907) 95% ДИ: [99,999%, 99,999%]

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

Откриване на туморна мутация

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

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



Откриване на генна амплификация

Откриването на генни амплификации чрез анализа TSO Comprehensive (EU) беше сравнено с резултатите от същия WES анализ, използвайки туморни нормални съвпадащи проби или проби само от тумор. Общо имаше 420 проби, 183 от които използваха ортогоналния туморен/нормален метод, а 237 използваха само туморния метод. От 420-те проби, 50 проби са избрани за проучването, защото те са положителни на амплификация с TSO Comprehensive (EU) или предшественик на анализ. Ефективността на тези характеризирани проби се коригира с използване на средно разпространение на сливанията. Комбинираната производителност при характеризирани и нехарактерни проби използва претеглена средна стойност с обратна вариация. Пробите бяха от 14 вида тъкани и съдържат амплификация от 55 гена. TSO Comprehensive (EU) съобщава за генни амплификации от MET и ERBB2 гени. Въпреки това точността беше оценена за всички 55 гена. Резюме за обозначаванията на генни амплификации е показано в Таблица 76.

Таблица 76 Обобщение на съответствието за генни амплификации

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

* Доверителен интервал, изчислен чрез bootstrap.

Амплификациите на ERBB2 (HER2) в стомашна и гръдна тъкан бяха анализирани отделно от други генни амплификации с помощта на двоен in-situ метод на хибридизация (Dual In-Situ Hybridization Method, DISH). Бяха тествани общо 116 проби от гърда и стомах, от които 64 преди това са били характеризирани като HER2 положителни от ИНС или FISH. Една проба е неуспешна при екстракция, 4 проби не са валидни за TSO Comprehensive (EU) и 3 проби не са валидни за DISH анализ. От 108-те проби 20 (18,5%) са имали гранични резултати (между 1,5 и 2,5) близо до границата на DISH от 2,0. Резултатите за съгласуваност, включително PPA, NPA за всички проби, с изключение на граничните случаи на HER2 DISH, са показани в [Таблица 77](#).

Таблица 77 Резюме на съгласуваността между TSO Comprehensive и HER2 DISH, включително за амплификация на ген HER2

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

Откриване на микросателитна нестабилност

Откриването на микросателитна нестабилност чрез TSO Comprehensive (EU) анализа беше сравнено с резултатите от валидиран MSI-PCR тест, който използва туморни нормални съпадащи проби за тестване. Сравнени са общо 195 проби, отговарящи на изискването за туморно съдържание от $\geq 30\%$ (MS-стабилен статус) и представляващи 14 типа тъкани. С MSI-PCR се оценяват 5 места и има 3 резултата – MSI-Stable (без нестабилни места), MSI-Low (едно нестабилно място) и MSI-High (две или повече нестабилни места). С TSO Comprehensive (EU) се оценяват до 130 микросателитни места и пробите се квалифицират само като MS-Stable или високи MSI-High ($\geq 20\%$ нестабилни места). MSI-Low са групирани с MS-Stable резултати за MSI-PCR. Анализът на съгласуваността е показан в [Таблица 78](#).

Таблица 78 Резюме на анализа на съгласуваността между TSO Comprehensive (EU) и MSI-PCR за нестабилност на DNA микросателит

MSI статус	PCR високи MSI	PCR ниски MSI	PCR стабилни MSI
TSO Comprehensive (EU) Нестабилни (MSI-висока)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Стабилни (MS-стабилни)	3	0	150
Общо	44	2	150
Процентно съответствие	PPA: 93% (41/44) 95% ДИ: [82%, 98%]	NPA: 99% (150/152) 95% CI: [95%, > 99%]	

Откриване на RNA сплайс варианти

Точността за откриване на сплайс варианти е изчислена чрез сравняване на резултатите от TSO Comprehensive (EU) с qPCR анализи за пропускане на EGFRvIII и Met Exon 14, включително една известна положителна RNA за всеки от сплайс вариантите. Анализът на съгласуваност беше извършен върху общо 230 уникални FFPE RNA проби от 14 типа тъкани с налични данни както от TSO Comprehensive (EU), така и от референтния метод. Всички проби са тествани за пропускане на MET exon 14, докато EGFRvIII е тестван, съответно, само в мозъчна тъкан. Три проби, обозначени положителни за пропускане на MET exon 14 чрез qPCR, но не чрез TSO Comprehensive (EU), имат среден Ct > 37 и са под TSO Comprehensive (EU) нивото на LoD. [Таблица 79](#) обобщава резултатите от проучването за съгласуваност.

Таблица 79 Резюме на анализа на съгласуваност между TSO Comprehensive (EU) и qPCR анализ за RNA сплайс варианти

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

Откриване на сливане на RNA

Сравнение с комбинирания метод

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

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

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

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

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

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

От 255-те проби, 35 проби са избрани за проучването, защото са били положителни за сливания с TSO Comprehensive (EU) или предшественик на анализ. Ефективността на тези характеризирани проби се коригира с използване на средно разпространение на сливанията. Комбинираната производителност при характеризирани и нехарактерни проби използва претеглена средна стойност с обратна вариация. Комбинирани резултати за съгласуваност за сливания са показани в [Таблица 80](#).

Тези 66 сливания (54 уникални сливания), които съвпадат с комбинирания метод, представляват 43 гена в TSO Comprehensive (EU) панела. Въпреки това сливанията са допустими за докладване само от 23-те гена, посочени в [Таблица 80](#).

Таблица 80 Обобщение на съответствието за РНК сливания

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

* Доверителен интервал, изчислен чрез bootstrap.

Сравнение с FISH метод за ROS1 и ALK сливания

Двадесет и пет NSCLC проби бяха тествани от FISH както за ROS1, така и за ALK сливания и 5 допълнителни NSCLC проби бяха тествани за сливане на ROS1. Осем проби не можаха да бъдат тествани от FISH за ROS1 поради неподходяща тъкан. Две ROS1 и едно ALK сливане бяха открити, както от TSO Comprehensive (EU), така и от FISH. Не са наблюдавани противоречиви резултати. [Таблица 81](#) обобщава резултатите за съгласуваност на TSO Comprehensive (EU) и метода FISH за ROS1 и ALK сливания.

Таблица 81 Обобщение на резултатите за съгласуваност на TSO Comprehensive (EU) и метода FISH за ROS1 и ALK сливания

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

Валидност на пробата

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

на ДНК/TMB, MSI, генни амплификации, сливания/сплайс варианти) и са показани в Таблица 82. Предвижда се допълнително намаляване на валидността на MSI с 1% за блокове с FFPE ≤ 2 години поради изпращане на реагенти.

Таблица 82 Валидност на пробата

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

Обобщение на аналитичното валидиране за обозначавания за туморно профилиране

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

- Малки варианти на DNA – SNV, MNV, инсерции и делеции.
- TMB
- MSI
- MET и ERBB2 (HER2) генни амплификации (вижте Таблица 2).
- 23 гена, за които могат да бъдат открити сливания (вижте Таблица 2).
- EGFR и MET сплайс варианти (вижте Таблица 2).

Клинична ефективност на NTRK

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

NCT02122913 е многоцентрово, открито, фаза 1 проучване за повишаване на дозата при възрастни пациенти с напреднали солидни тумори (всички участници), неизбрани за положителен за NTRK сливания рак. След частта за повишаване на дозата от проучването беше започнато разширяване на дозата за пациенти с документиран положителен за NTRK сливане рак и за пациенти, за които изследователят смята, че могат да се възползват от високо селективен TRK инхибитор. NAVIGATE NCT02576431 е текущо, многоцентрово, открито, фаза 2 проучване тип „кошница“ при пациенти на

възраст 12 и повече години с повтарящи се напреднали солидни тумори с документирано NTRK сливане, оценено от външна лаборатория. SCOUT NCT02637687 е текущо, многоцентрово, открито, фаза 1/2 проучване при педиатрични пациенти на възраст от раждането до 21 години с напреднали солидни или първични тумори на централната нервна система (ЦНС).

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

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

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

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

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

Кръстосана табулация на резултатите за 499 проби е показана в [Таблица 83](#). От 499 проби, 85 проби са имали невалидни резултати от анализа TSO Comprehensive (EU); от тези 85, 53 са имали и невалидни резултати от ортогоналния метод. Допълнителни седем проби са имали невалидни резултати от ортогоналния метод. Така 407 от 499 проби са имали валидни резултати от двата метода.

Таблица 83 Проучване за точност на NTRK: Кръстосано представяне в таблица на резултат от TSO Comprehensive (EU) спрямо резултат от ортогонален метод за откриване на NTRK сливания

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

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

Анализите за съответствие, като се изключат и като се включат невалидните TSO Comprehensive (EU) резултати от анализа, са показани в Таблица 84. Като се изключат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU), PPA е 96,6% (114/118; 95% ДИ: 91,5% – 99,1%), а NPA е 94,5% (273/289; 95% CI: 91,2% – 96,8%).

Таблица 84 Проучване за точност на NTRK: PPA и NPA на анализа TSO Comprehensive (EU) в сравнение с резултата от ортогоналния метод за откриване на NTRK сливания

Измерване на съответствие	Като се изключат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU)		Като се включат невалидните резултати от анализа TSO Comprehensive (EU)	
	Съответствие, % (n/N)	95% ДИ*	Съответствие, % (n/N)	95% ДИ*
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% ДИ, основан на (точен) метод на Clopper-Pearson.

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

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

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

Към крайния срок на данните 15 ЮЛИ 2019 г. са включени 279 пациенти. От 279 пациенти 208 са били положителни за NTRK сливане. От 208 положителни пациенти 164 формират ларотректиниб ePAS4.

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

Отчетност за пробите

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

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

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

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

Резултати за съгласуваност

Като цяло са тествани 437 проби от TSO Comprehensive (EU). Сред 208-те пациенти с положителен резултат от сливането на NTRK, има 153, които са имали налични проби и са тествани чрез TSO Comprehensive (EU), давайки 138 валидни резултати и 15 невалидни резултати.

Съответствие на резултати от TSO Comprehensive (EU) по отношение на резултатите от LT методите, със и без невалидните резултати от TSO Comprehensive (EU), са показани в [Таблица 85](#).

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

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

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

Анализът на чувствителността спрямо липсващите резултати от анализа TSO Comprehensive (EU) показаха стабилността на анализа на съответствието. Липсващи резултати от анализа TSO Comprehensive (EU) за положителни за NTRK сливане пациенти от LT (n = 70) са приписани с помощта на модел на логистична регресия. Оценките на съответствието, включително приписаните стойности, са показани в [Таблица 86](#).

Таблица 86 Клинично свързващо проучване NTRK: Съгласуваност между анализа TSO Comprehensive (EU) и методите за LT за откриване на NTRK сливания, включително приписани стойности за положителни пациенти в LT с липсващи резултати от анализа TSO Comprehensive (EU)

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

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

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

Съответствията между анализа TSO Comprehensive (EU) и LT по тип метод (например RNA NGS, FISH) са показани в [Таблица 87](#).

Таблица 87 Клинично свързващо проучване NTRK: Съгласуваност между анализа TSO Comprehensive (EU) и LT методите за откриване на NTRK сливания чрез тип метод на LT

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

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

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

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

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

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

Резултати за клинична ефикасност

В рамките на кохорта ePAS4 ефикасността на ларотректиниб в TSO Comprehensive (EU) положителна, положителна популация в LT (97 пациенти, ORR=78,4%, 95% [ДИ68,8%, 86,1%]) е подобна на ефикасността на ларотректиниб в общата популация на ePAS4 (164 пациенти, ORR=72,6%, 95% CI [65,1%, 79,2%]) (Таблица 88). От 97 TSO Comprehensive (EU) положителни пациенти в ePAS4, 28 (28,9%) пациенти са постигнали пълен отговор/пълен хирургичен отговор и 48 (49,5%) пациенти са постигнали частичен отговор.

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

Таблица 88 Клинично свързващо проучване NTRK: ORR за положителни пациенти в LT чрез LT и TSO Comprehensive (EU) резултати в ePAS4

		Положителни за сливане в LT N=164	TSO Comprehensive (EU) Положителни и положителни в LT N=97	TSO Comprehensive (EU) Отрицателни и положителни в LT N=13
Най-добър цялостен отговор, n (%)	Пълен отговор	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Пълен хирургичен отговор	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Частичен отговор	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Стабилно заболяване	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Прогресивно заболяване	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Не оценяем	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Честота на цялостен отговор	Брой пациенти, n	164	97	13
	Брой пациенти с CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (95% ДИ*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

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

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

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

Литература

1. American Society of Clinical Oncology (Американско дружество по клинична онкология). www.asco.org. Достъп на 3 октомври 2016 г.
2. European Society for Medical Oncology (Европейско дружество по медицинска онкология). www.esmo.org. Достъп на 3 октомври 2016 г.

Хронология на редакциите

Редакция	Дата	Описание на промяната
Документ № 200007789 v08	май 2025 г.	<p>Премахнато е позоваването на софтуерни версии и номера на части.</p> <p>Актуализирани ограничения на процедурата</p> <ul style="list-style-type: none"> Информация за некротична тъкан. Информация за съдържанието на тумор в MSI. <p>Актуализирано:</p> <ul style="list-style-type: none"> Бележка под линия на NTC, която се прилага както за min, така и за max библиотеки. Оборудване и материали изброяват спецификациите на центрофугата и стъпките на пипетата. Изчисление на SPB претоварване от 1,05x до 1,15x. Терминология за пропускане на MET екзон 14 del до MET екзон 14. <p>Добавено:</p> <ul style="list-style-type: none"> Забележка за SMB в Заснемане на цели едно и две. Подгответе се за въвеждане на секвениране. Допълнителна информация за ултразвуковия апарат. <p>Добавени пояснения и актуализирани резултати за характеристиките на изпълнение:</p> <ul style="list-style-type: none"> Смущаващи процеса вещества Точност на профилирането на тумора и валидността на пробата. Проучване 1 и 2 за граница на откриване. Вътрешнолабораторна прецизност в проучване 1. Проучване 2 за възпроизводимост. Стабилност на библиотеката и информация за съхранение на библиотеката. Граница на празна проба. <p>Актуализиран език и граматика.</p>

Редакция	Дата	Описание на промяната
Документ № 200007789 v07	януари 2024 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Добавена информация към „Ограничения на процедурата“: <ul style="list-style-type: none"> • Изисквания за проби от некротична тъкан и туморно съдържание за MSI-високи и соматични мутации. • Потенциални смущения от хемоглобина. • Граници на откриване в RET гена и обозначаване на сливане извън анотираните граници на гена. • Не се съобщават генни делеции. • Актуализиран за използване със софтуер TSO Comprehensive (EC) Local Run Manager версия 2.3.7. • Добавена е информация към необходимото, но не доставено оборудване и материали, включително две допълнителни конфигурации на ултразвуковия апарат. • Актуализирана информация за проби и препарати: <ul style="list-style-type: none"> • Съдържание на некротична тъкан. • Ефекти на протеиназа К и хемоглобин. • Съхранение на FFPE и пречистена нуклеинова киселина, монтирани на предметно стъкло. • Добавена е информация за подобряване на работата с реагенти, работния поток и отстраняване на неизправности при изпълнение на КК. • Добавен контекст и яснота към работните характеристики: <ul style="list-style-type: none"> • Кръстосано замърсяване • Оценка на комплект за извличане на нуклеинова киселина • Смущаващи процеса вещества • Нуклеинова киселина и стабилност на FFPE на предметни стъкла • Клинична ефективност на NTRK • Актуализиран език и граматика
Документ № 200007789 v06	февруари 2023 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Допълнителни декларации в раздел Ограничения • Езикови актуализации за конвенция, граматична коректност и яснота • Корекция на Таблици 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Декларация за наличие на утайки в реагента FSM • Актуализирани спецификации на термоциклера и ваничката в списъка с оборудване и материали
Документ № 200007789 v05	септември 2022 г.	Актуализирани таблици за възпроизводимост в Проучване 2

Редакция	Дата	Описание на промяната
Документ № 200007789 v04	юни 2022 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Добавени номера на части за модул за анализ TSO Comprehensive v2.3.5 • Премахнати номера на части за модул за анализ TSO Comprehensive v2.3.3 • Актуализирана терминология в раздел Граница на празна проба
Документ № 200007789 v03	април 2022 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Добавена информация за характеристиките на производителността, свързана с NTRK сливания • Добавена маркировка „САМО ЗА ИЗНОС“ • Актуализирана декларация за предназначена употреба за добавяне на иск за CDx на NTRK1-3 • Разширена информация за компонентите на продукта, за да включат номера на части на софтуерни компоненти
Документ № 200007789 v02	февруари 2022 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Поправена грешка в табличната справка • Добавено ограничение по отношение на варианти от герминативната линия и соматични варианти • Пояснен изказ относно откриването на генна амплификация
Документ № 200007789 версия 01	декември 2021 г.	<ul style="list-style-type: none"> • Актуализирани ограничения на процедурата • Пояснени спецификации на магнитната стойка и термоциклера в списъците на оборудването и материалите
Документ № 200007789 v00	ноември 2021 г.	Първоначална версия

Патенти и търговски марки

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

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

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

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

© 2025 г. Illumina, Inc. Всички права запазени.

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

Информация за контакт



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



Етикетиране на продукта

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