

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Tájékoztatófüzet

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA. CSAK EXPORTÁLÁSI CÉLOKRA.

Rendeltetés

A TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) egy *in vitro* diagnosztikai teszt, amely célzott újgenerációs szekvenálást alkalmaz 517 gén variánsainak kimutatására formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) tumorszövetmintákból kivont nukleinsavak felhasználásával, szolid rosszindulatú daganatokban szenvedő rákos betegektől, az Illumina® NextSeq™ 550Dx készülék használatával. A teszt felhasználható egyetlen nukleotidvariáns, több nukleotidvariáns, inszerciók, deléciók és génamplifikációk kimutatására DNS-ből, valamint génfúziók és splice-variánsok kimutatására RNS-ből. A teszt tumormutációs terhelési (TMB) pontszámot és mikroszatellita-instabilitási (MSI) státuszt is jelent.

A teszt társdiagnosztikai eszközként szolgál a daganatos betegek azonosítására az [1. táblázat](#) felsorolt célzott terápiával történő kezeléshez, a jóváhagyott terápiás termék címkének megfelelően. Ezenkívül a teszt célja, hogy a szakképzett egészségügyi szakemberek általi használatra tumorprofilozási információkat szolgáltatasson, a szakmai útmutatásoknak megfelelően, és nem meggyőző vagy nem előíró bármely specifikus terápiás termék alkalmazási előírás szerinti használata tekintetében.

1. táblázat . Társdiagnosztikai indikáció

Tumor típusa	Biomarkerek	Célzott terápia
Szolid tumorok	NTRK1, NTRK2 és NTRK3 génfúziók	VITRAKVI® (larotrectinib)

A vizsgálat összefoglalása és magyarázata

Klinikai ismertetés

A rák világszerte vezető halálok, és bármely szövetből származhat.^{1, 2} A rák genetikai alapú elemzése fontos azon betegek azonosításához, akiknél a célzott terápiák előnyösen alkalmazhatók, valamint új kezelési módszerek kifejlesztéséhez. Számos gén szerepet játszik a rák okozásában vagy progressziójában, és sok rák számos variánst hordoz, amelyek befolyásolják ezeket a géneket és azok funkcióját. Ezek a variánsok tartalmazhatnak génmutációkat, például egy-nukleotid variánsokat (SNV), több-nukleotid variánsokat (MNV), inszerciókat vagy deléciókat, génamplifikációkat, génfúziókat és splice-variánsokat. A rák génmutációinak másik következménye a rák-specifikus immunválaszt kiváltó neoantigének megjelenése. A rák mutációs állapotát a TMB és az MSI tudja ábrázolni, amelyek a genomikai instabilitással és rákneoantigén megjelenésével összefüggő genomi aláírások.

A TruSight Oncology Comprehensive egy kvalitatív újgenerációs szekvenálási (NGS) komprehenzív genomikai profilozási (CGP) teszt, amely széles körben értékeli a genomikai variánsokat a [2. táblázat](#) felsorolt, rákhoz kapcsolódó gének nagy paneljában. A vizsgálat kis variánsokat mutat ki 517 génben, valamint génamplifikációkat, fúziókat és splice-variánsokat a [2. táblázat](#) jelzettek szerint. A vizsgálat a TERT kivételével az összes gén kódolási szekvenciájának lefedettségét biztosítja, ahol csak a promóter régiót fedik le, és a TMB-pontszámot és az MSI státuszt értékeli. Ezek a vizsgálati célok magukban foglalják a szakmai szervezetek és más jelentős egyesült államokbeli irányelvek által idézett tartalmakat. A független konzorciumok publikációi és a késői stádiumú gyógyszerkutató is befolyásolta a TSO Comprehensive vizsgálat elrendezését.

A variánsazonosításból kizárt régiók listáját lásd az Illumina [támogatási vizsgálóhelyen elérhető TruSight Oncology Comprehensive Block List \(dokumentumszám: 200009524\) kiadványt](#).

A [2. táblázat](#) négy variánstípus-kategóriát azonosít: Kis DNS variáns (S), génamplifikáció (A), fúzió (F) és splice-variáns (Sp). A kis DNS-variánsok közé tartoznak az SNV-k, MNV-k, valamint az inszerciók és deléciók.

2. táblázat TSO Comprehensive (EU) Vizsgálati génpanel

Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa
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	PDCC1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCC1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S

Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa
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
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

Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa
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	INHHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S

Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa
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
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRF1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S

Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa	Sz.	Entrez azonosító	Gén	Variáns típusa
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	500ú	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	ZFH3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	NA	NA	NA	NA
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	NA	NA	NA	NA
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	NA	NA	NA	NA
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	NA	NA	NA	NA
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	NA	NA	NA	NA
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	NA	NA	NA	NA
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	NA	NA	NA	NA
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	NA	NA	NA	NA

Az eljárás működési elve

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat egy manuálisan végzett elosztott teszt, amelyet extrahált nukleinsavval végeznek bemeneti anyagként. A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetből kivont DNS-t és/vagy RNS-t könyvtárak készítéséhez használják fel, amelyeket ezután dúsítanak a rákkal-kapcsolatos génekhez, és szekvenálnak a(z) NextSeq 550Dx készüléken.

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat a következő folyamatokat foglalja magában.

- **Könyvtár előkészítése és dúsítása**—RNS-esetén összesen 40 ng-ot konvertálnak két szálás komplementer DNS-hez (cDNS). Genomikai DNS (gDNS) esetén 40 ng gDNS-t kis fragmentumokra metszenek. A szekvenáláshoz használt univerzális adaptereket a cDNS- és gDNS-fragmentumokra ligálják. Minden könyvtárba P5 és P7 adapter szekvenciák vannak beépítve, amelyek lehetővé teszik a könyvtári fragmentumok felvételét az áramlásos cella felületére szekvenálás közben. Az adapterek i5 és i7 index szekvenciákat tartalmaznak minden egyes egyéni minta, valamint a gDNS-mintákból származó könyvtárak esetén az egyedi molekuláris azonosítók (UMI) használatával rendelkező egyedi molekulák azonosítására. A könyvtárakat ezután egy befogáson alapuló módszerrel dúsítják a specifikus génekre. A vizsgálat által célzott génrégiókat lefedő biotinilált próbaszekvenciákat hibridizálják a könyvtárakkal. A próbákat és a hibridizált célzott könyvtárakat nem célzott könyvtárakból izolálják sztreptavidin mágneses részecskékkel történő rögzítéssel. A célul kitűzött dúsított könyvtárak mosásra és amplifikálásra kerülnek. Az egyes dúsított könyvtárak mennyiségét ezután gyöngyalapú módszerrel normalizálják, hogy egyenlő reprezentációt biztosítsanak az összevont könyvtárakban a szekvenáláshoz.
- **Sorba rendezés és elsődleges elemzés**—A normalizált, dúsított könyvtárakat összevonjuk és egy áramlásos cellába csoportosítjuk, majd szintetikus (SBS) kémiai szekvenálással szekvenáljuk a NextSeq 550Dx-n. Az SBS során az egyszeres, fluoreszcensen jelzett dezoxinukleotid-trifoszfát (dNTP) bázisok kimutatása reverzibilis terminátor módszerrel történik, amint azok beépülnek a növekvő DNS-szálakba. Minden szekvenálási ciklusban a nukleinsavlánchoz egy dNTP-t adnak hozzá. A dNTP címke a polimerizáció lezáróelemeként szolgál. Minden egyes dNTP beépítése után a készülék képet készít a fluoreszcens festékről a bázis azonosításához, majd a festék lehasításra kerül, lehetővé téve a következő nukleotid beépítését. Négy reverzibilis, terminátorhoz kötött dNTP (A, G, T és C) van jelen egyetlen, különálló molekulaként. Ennek eredményeképpen a természetes verseny minimálisra csökkenti a beilleszkedési torzítást. Az elsődleges elemzés során az alapazonosítások közvetlenül az egyes szekvenálási ciklusok során végzett jelintenzitás-mérésekből történnek, ami bázisról-bázisra szekvenálással történik. Minden egyes alapazonosításhoz minőségi pontszámot rendelnek hozzá.
- **Másodlagos elemzés**—A Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul a Local Run Manager szoftver részeként a NextSeq 550Dx készüléken található a futtatás beállításának megkönnyítése TSO Comprehensive (EU) és a szekvenálási eredmények másodlagos elemzése érdekében. A másodlagos elemzés magában foglalja a futtatás feldolgozásának és a minőségellenőrzésnek az érvényesítését, majd a demultiplikálást, a FASTQ-fájlgenerálást, az igazítást és a variánsazonosítást. A demultiplikálás szétválasztja az összegyűjtött könyvtárakból származó adatokat a könyvtár előkészítési eljárás során hozzáadott egyedi szekvenciájú indexek alapján. A FASTQ-köztes fájlok generálódnak, amelyek tartalmazzák az egyes minták szekvenálási leolvasásait és a hozzájuk tartozó minőségi pontszámokat, a szűrőn át nem ment klaszterek kizárásával. A szekvenálási leolvasásokat a rendszer összehasonlítja a referencia genommal, hogy azonosítsa a szekvenciák közötti kapcsolatot, és pontszámot ad a területek hasonlósága alapján. Az illesztett leolvasásokat BAM-formátumú fájlba írja. A vizsgálati szoftver külön algoritmusokat használ a DNS- és/vagy RNS-mintákból létrehozott könyvtárakhoz a kis DNS-variánsok, a génamplifikációk, a TMB és az MSI DNS-mintákhoz, valamint a fúziók és a splice-variánsok RNS-mintákhoz való azonosításához. Az elemző szoftvermodul több kimenetet generál, beleértve a szekvenálási mérőszámokat és a Változóazonosítási formátum (VCF) fájlokat. A VCF-fájlok a

referencia genom meghatározott helyein található variánsokról tartalmaznak adatokat. A rendszer minden mintához létrehozza a mérőszámokat és az egyedi kimeneti fájlokat. A másodlagos és harmadlagos elemzés részleteit lásd: *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661)*.

- **Harmadlagos elemzés**—A Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul által végzett harmadlagos elemzés TMB- és MSI-számításokból, társdiagnosztikai azonosításból, a variánsoknak a klinikai jelentőség két szintjére történő tumorprofilozásából áll, a tudásbázis (KB) és a szövettípus felhasználásával, valamint eredményjelentés létrehozásával. A tumorprofilozást átfogó genomikai profilozásnak is nevezik. A kiértékelt variánsok eredményei, valamint a TMB és MSI biomarker-eredmények összegzése a TSO Comprehensive (EU) eredményjelentésben található.

Az eljárás korlátai

Kizárólag *in vitro* diagnosztikai használatra.

- Csak a rendelt célra való használatra. A tesztet a klinikai laboratóriumi előírásoknak megfelelően kell használni.
- A rendeltetészerű használat [2. táblázat](#) felsorolt genomikai eredményei nem előíró jellegűek és nem meggyőzőek egyetlen konkrét terápiás termék címkézett használatára vonatkozóan sem.
- A TSO Comprehensive (EU) eredményjelentésben a Klinikai jelentőségre (2. szint) utaló genomikai eredmények és a potenciálisan klinikai jelentőségű (3. szint) genomikai eredmények között felsorolt variánsok esetében nem végeztek klinikai validálást.
- A betegellátással és kezeléssel kapcsolatos döntéseknek a kezelőorvos független orvosi megítélésén kell alapulniuk, figyelembe véve a beteg állapotára vonatkozó összes vonatkozó információt, mint például a beteg és a családi kórtörténet, fizikális vizsgálatok, más diagnosztikai tesztekkel származó információk és a beteg preferenciái, az adott közösség szokásos ellátásának megfelelően.
- Az FFPE-minta minősége nagyon változó. Azok a minták, amelyek nem estek át a szokásos rögzítési eljárásokon, nem feltétlenül termelnek olyan extrahált nukleinsavakat, amelyek megfelelnek a vizsgálat minőségellenőrzési követelményeinek ([Minőség-ellenőrzés a\(z\) 80. oldalon](#)). Az öt évnél hosszabb ideig tárolt FFPE-blokkok alacsonyabb érvényességet mutattak.
- A TSO Comprehensive (EU) teljesítményét szerv- vagy szövetátültetésen átesett betegekből származó mintákban nem értékelték.
- A nagy mennyiségű ($\geq 23\%$) nekrotikus szövet befolyásolhatja a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat azon képességét, hogy kimutassa a génamplifikációkat és az RNS-fúziókat.
- Előfordulhat, hogy a szomatikus meghajtó mutációk nem észlelhetők megbízható módon, ha a (terület szerinti) tumortartalom kevesebb mint 20%.
- A stabil mikroszatellita (MS-stabil) eredmény megbízhatatlan lehet, ha a tumortartalom kevesebb mint 30%. A mikroszatellita magas (MSI-magas) eredmény helyes, függetlenül a tumor tartalmától.
- A szövettel kapcsolatos hemoglobin csökkenti a MET splice variánsok támogató kiolvasásait.

- A deléciókkal és a heterozigótaság elvesztésével járó, erősen átrendezett genomokban a TSO Comprehensive (EU) szoftver a DNS-mintát tévesen szennyezettnek sorolhatja be (CONTAMINATION_SCORE > 3106 és p-érték > 0,049).
- A negatív eredmény nem zárja ki a vizsgálat kimutatási határértékei (LoD) alatti mutáció jelenlétét.
- A kis DNS-variánsok kimutatásának érzékenységét a következők befolyásolhatják:
 - Alacsony komplexitású genomikai környezet.
 - Növekvő variánshossz.
- A TMB-pontszámok pontatlanok lehetnek a következő kontextusokban:
 - Ahogy a tumortartalom eléri azokat a szinteket, ahol a csírvonal és a szomatikus variáns allélfrekvenciák (VAF-ek) konvergálnak.
 - A nyilvános adatbázisokban nem jól reprezentált populációkban.
- A TSO Comprehensive (EU) által jelentett egyetlen kópiaszám-variánsok a génamplifikációk. A géndeléciókat a vizsgálat nem jelenti.
- Előfordulhat, hogy a TSO Comprehensive (EU) vizsgálati szoftverben található Fusion-hívási algoritmusok nem veszik figyelembe az annotált génhatárokon kívül eső kiolvasásokból származó bizonyítékokat.
- A fúziók észlelésének érzékenységét befolyásolhatja:
 - Az alacsony könyvtári összetettség miatt a támogató leolvasások a vizsgálati munkafolyamat eltérései miatt csökkentek (például kövesse a keverési lépéseket: [RNS semlegesítése és lágyítása a\(z\) 43. oldal](#)).
 - Amikor egy gén mindkét töréspontot lefedi.
 - Azokban az esetekben, amikor több fúziós töréspont van közel egymáshoz egy vagy több partnerrel, a több töréspont és partner egyetlen töréspontként és partnerként is jelentésre kerülhet.
 - Kis medián inszerciós méretekkel. Kis medián inszerciós méretek esetén 80 bp minimális medián inszerciós méret szükséges, de az érzékenység csökken a 80–100 bp tartományban.
 - Alacsony szekvenciájú komplexitás vagy homológ genomikai környezet segítségével a fúziós töréspontok körül.
- A fúzióban részt vevő gének rendeződését befolyásolhatja, ha a fúziós töréspontok az átfedő géneket tartalmazó genomikai régiókban fordulnak elő. A vizsgálat az összes gént jelenti, pontosvesszővel elválasztva, ha több gén átfedésben van egy törésponttal.
- A TERT promóterrégiójának következtelen lefedettsége az alacsony mélység miatt eredménytelen lehet.
- Az annotációs vagy KB hibák álpozitív vagy álnegatív eredményt okozhatnak, beleértve egy variáns rossz szinten történő felsorolását (a Genomikai eredmények klinikai jelentőség bizonyítékával [2. szint] és a Genomikai eredmények potenciális klinikai jelentőséggel [3. szint] között), vagy a jelentésben szereplő annotációs információk helytelenek lehetnek. A CDx eredményekben jelentett variánsokat nem befolyásolják a jegyzetelési vagy KB hibák. A hiba lehetősége a következő három forrásból ered:
 - TSO Comprehensive (EU) variáns annotáció. A COSMIC v92 2448350 variánsának elemzése alapján a hibaarány körülbelül 0,0027%, ezért a hiba valószínűsége alacsony.

- KB hiba a kurációs folyamat miatt.
- A KB-tartalom jelentősége idővel változik. A jelentés a KB-verzió összeállításának időpontjában szerzett tudást tükrözi.
- A TSO Comprehensive (EU) szomatikus variánsok jelentésére szolgál, amikor klinikai jelentőséggel bíró variánsokat vagy potenciális klinikai jelentőséggel bíró variánsokat jelentenek. Csak tumorvizsgálatként lehetséges a csírvonal (örökölt) variánsok jelentése, de nem szándékolt. A TSO Comprehensive (EU) KB-t használ a variánsok jelentésére anélkül, hogy kifejezetten megjelölne, hogy csírvonal- vagy szomatikus eredetűek-e.
- A KB csak olyan terápiás, diagnosztikai és prognosztikai összefüggéseket foglal magában, amelyek relevánsak a szilárd rosszindulatú neoplazmában jelen lévő variánsok szempontjából. A KB nem foglalja magában az érzékenységi vagy rákkockázati összefüggéseket.
- Az alábbi táblázat három olyan RET-variáns nukleotidváltozásait jeleníti meg, amelyeket a vizsgálat nem képes észlelni. Ugyanannak az aminosavnak az egyéb nukleotidváltozásai is kimutathatók.

3. táblázat Nukleotidváltozások három RET-variáns esetében

Aminosav változása	Kr*	Elhelyezkedés	Referencia allél	Alternatíva
p.E632_ A640delinsVRP	10. kr.	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGC C	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	10. kr.	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	10. kr.	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

* Kr. = kromoszóma

A termék összetevői

A TSO Comprehensive (EU) teszt a következő komponensekből áll:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) készlet (Illumina-katalógusszám: 20063092) – A készlet elegendő mennyiségű reagenst tartalmaz, amelyek alkalmasak 24 DNS- és 24 RNS-könyvtár létrehozásához. Ez a mennyiség magában foglalja a betegmintákat és a kontrollokat. A kontrollok külön vásárolhatók meg (lásd: [Szükséges, de nem szállított reagensek a\(z\) 16. oldalon](#)).
- Tudásbázis: Rendszeresen frissül, és letölthető a Illumina Lighthouse Portálról.

- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul (Illumina-katalógusszám: 20051843), amely a következő összetevőket tartalmazza:
 - TSO Comprehensive Reklamációs csomagok
 - TSO Comprehensive Szoftvercsomag
 - TSO Comprehensive USB-készlet

A Illumina szervizképviselője telepíti a TSO Comprehensive (EU) elemzési modul megfelelő verzióját ide: Local Run Manager NextSeq 550Dx készülék. Az elemzési modullal kapcsolatos információkat lásd: Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661).

Reagensek

Szállított reagensek

A TSO Comprehensive (EU) készlethez a következő reagensek tartoznak.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Reagens	Cikkszám	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolási hőmérséklet
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Sókat és nukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Sókat, DNS-polimerázokat, RNáz-H-t és nukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Sókat és random hexamereket tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Reverz transzkriptázt tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között

TruSight Oncology Comp Library Prep (fagyasztó), PN 20031118

Reagens	Cikkszám	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolási hőmérséklet
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	T4 DNS-polimerázokat és polinukleotid kinázokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Sókat és nukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Ligázt tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Univerzális szekvenáló oligonukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Univerzális szekvenáló oligonukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	DNS-polimerázokat és nukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között

TruSight Oncology Comp Library Prep (hűtő), PN 20031119

Reagens	Cikkszám	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolási hőmérséklet
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat	2 °C és 8 °C között
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Mágneses gyöngyöket tartalmazó vizes oldat	2 °C és 8 °C között
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA-oldat	2 °C és 8 °C között

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

Hatóanyagok: Pufferelt vizes oldat, amely egyedileg vonalkódzott oligonukleotid primereket tartalmaz.

**FIGYELEM!**

RNS- vagy DNS-mintákhoz használjon egyedi indexprimereket (UPxx). Ne kombinálja a CPxx és UPxx indexprimereket ugyanabban a könyvtárban.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Hatóanyagok: Pufferelt vizes oldat, amely egyedileg vonalkódzott oligonukleotid primereket tartalmaz.

**FIGYELEM!**

Kombinátor indexprimereket (CPxx) csak DNS-mintákhoz használjon. Ne kombinálja a CPxx és UPxx indexprimereket ugyanabban a könyvtárban.

Indexprimer	Cikkszám	Darab	Térfogat	i7 Index	Szekvenálás	i5 Index	Szekvenálás	Tárolási hőmérséklet
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C és -15 °C között
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C és -15 °C között
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C és -15 °C között
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C és -15 °C között
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C és -15 °C között
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C és -15 °C között
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C és -15 °C között
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C és -15 °C között
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C és -15 °C között
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C és -15 °C között
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C és -15 °C között
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C és -15 °C között
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C és -15 °C között
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C és -15 °C között
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C és -15 °C között
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C és -15 °C között

TruSight Oncology Comp Enrichment (hűtő), PN 20031123

Reagens	Cikkszám	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolási hőmérséklet
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Formamidot és sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat	2 °C és 8 °C között
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Sókat és szilárd fázisú, sztreptavidinnel kovalensen bevont paramágneses gyöngyöket tartalmazó pufferelt vizes oldat	2 °C és 8 °C között

Reagens	Cikkszám	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolási hőmérséklet
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Nátrium-hidroxid-oldat	2 °C és 8 °C között
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Pufferelt vizes oldat	2 °C és 8 °C között
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Szilárd fázisú paramágneses gyöngyöket tartalmazó pufferelt vizes oldat	2 °C és 8 °C között
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat 2-merkaptóetanol és formamid	2 °C és 8 °C között
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat	2 °C és 8 °C között
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat	2 °C és 8 °C között
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Mágneses gyöngyöket tartalmazó vizes oldat	2 °C és 8 °C között

TruSight Oncology Comp Enrichment (fagyasztó), PN 20031121

Reagens	Cikkszám	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolási hőmérséklet
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Oligonukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Mosószert tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között

Reagens	Cikkszám	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolási hőmérséklet
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	DNS-polimerázokat és nukleotidokat tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	P5 és P7 primeket tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat 2- Merkaptóetanol és formamid	-25 °C és -15 °C között
PhiX Internal Control (PX3 vagy PhiX)	20031492	1	10 µl	PhiX genomikus DNS-t tartalmazó pufferelt vizes oldat	-25 °C és -15 °C között

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reagens	Cikkszám	Darab	Térfogat	Hatóanyagok	Tárolási hőmérséklet
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotid szondakészlet	-25 °C és -15 °C között
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotid szondakészlet	-25 °C és -15 °C között

Szükséges, de nem szállított reagensok

Amplifikáció előtt használatos reagensok

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents—A reagensre vonatkozó követelményeket lásd: [Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a\(z\) 26. oldalon.](#)
- DNA and RNA Quantification Reagents—A reagensre vonatkozó követelményeket lásd: [Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a\(z\) 26. oldalon.](#)
- TruSight onkológia Kontrollok:
 - TruSight onkológia DNA-Control (Illumina-katalógusszám: 20065041)
 - TruSight onkológia RNA-Control (Illumina-katalógusszám: 20065042)
- Etanol (EtOH) 100% (200 bizonyíték), molekuláris biológiai minőségű
- RN-áz-/DN-áz-mentes víz

Amplifikáció után használatos reagensek

- NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (Illumina-cikkszám: 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 ciklus)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklus)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 ciklus)
- EtOH 100% (200 fok), molekuláris biológiai minőségű
- RN-áz-/DN-áz-mentes víz

Reagens tárolása és kezelése

A következő reagensdobozokat fagyasztva szállítják. -25 °C és -15 °C között tárolandó.

Doboz	Cikkszám	Laboratóriumi terület
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Amplifikáció előtt
TruSight Oncology Comp Library Prep (fagyasztó)	20031118	Amplifikáció előtt
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Amplifikáció előtt
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Amplifikáció előtt
TruSight Oncology Comp Enrichment (fagyasztó)	20031121	Amplifikáció után
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Amplifikáció után



FIGYELEM!

Ne tárolja a reagenseket fagymentes tárolóegységben vagy hűtőszekrényajtó-rekeszekben.

A következő reagensdobozokat gélcsomagokban szállítják a 0–10 °C-os hőmérséklet fenntartása érdekében. 2–8 °C-on tárolandó.

Doboz	Cikkszám	Laboratóriumi terület
TruSight Oncology Comp Library Prep (hűtő)	20031119	Amplifikáció előtt
TruSight Oncology Comp Enrichment (hűtő)	20031123	Amplifikáció után



FIGYELEM!

Ne fagyassza le a gyöngyöket tartalmazó reagenseket (LNB1, SPB és SMB).

- A reagensek fizikai jellemzőinek megváltozása az anyagok romlását jelezheti. Ne használjon olyan reagenst, amelynek a fizikai jellemzői megváltoznak (például a színe jól látható módon megváltozik vagy zavarosság látható).
- Az FSM, SSM, ERA1-B és TCB1 tartalmazhat termékekhez kapcsolódó részecskéket. Kövesse az egyes reagensekre vonatkozó kezelési irányelveket. Az FSM- és SSM-keverési lépések elvégzése után a visszamaradó fehér, termékkel kapcsolatos részecskék nem befolyásolják a teljesítményt.
- A TSO Comprehensive (EU) teszt stabilitását értékelték, és a teljesítményt a készlet legfeljebb négy felhasználása esetén igazolták. A reagensek a megadott hőmérsékleteken történő tárolás esetén a doboz címkéjén feltüntetett lejárati dátumig stabilak.

Eszközök és anyagok

Szükséges, de nem szállított eszközök és anyagok

Amplifikáció előtti berendezések és anyagok

Berendezés	Beszállító
Ultrasonikátor a hozzá tartozó tartozékokkal Lásd az Ultrasonikátor konfigurációs beállítások DNS-fragmentációhoz a(z) 22. oldalon .	Általános laboratóriumi beszállító
Hőváltóztató inkubátor a következő jellemzőkkel: <ul style="list-style-type: none"> • Fűtött fedél, amely 30 °C-ra és 100 °C-ra állítható (vagy kikapcsolható, ha nem képes 30 °C-ra) • 4 °C—99 °C hőmérséklettartományt foglal magában • ±0,25 °C hőmérsékletpontosság • Kompatibilis a 96 üregű, 0,2 ml-es PCR-lemezekkel • Lásd: Hőciklus-szabályozó felfutási sebessége a(z) 23. oldalon 	Általános laboratóriumi beszállító
Kémcsőkeverő	Általános laboratóriumi beszállító
Mikrominta-inkubátorok (2) betétekkel a 96 cellás MIDI-lemezekhez (2)	Általános laboratóriumi beszállító
Mikrocentrifuga	Általános laboratóriumi beszállító
Lemezcentrifuga a következő jellemzőkkel: <ul style="list-style-type: none"> • Kompatibilis a 96 üreges mikrolemezekkel • Képes 280 x g-re (+/- 10%) 	Általános laboratóriumi beszállító

Berendezés	Beszállító
Lemezrázó a következő jellemzőkkel: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm-es körpálya • Rázatható 1200 fordulat/perc és 1800 fordulat/perc sebességgel 	Általános laboratóriumi beszállító
Tömítő ék vagy görgő	Általános laboratóriumi beszállító
Mágneses állvány a következő specifikációkkal: <ul style="list-style-type: none"> • Paramágneses gyöngylecsapáshoz/elválasztáshoz tervezve • Mágnesek az állvány oldalán (nem az alján) • Kompatibilis a 96 üreges MIDI-lemezekkel 	Általános laboratóriumi beszállító
A 2 µl és 1000 µl közötti térfogat pontos leadására alkalmas precíziós pipetták a következő specifikációkkal: <ul style="list-style-type: none"> • Egy- vagy többcsatornás pipetta 0,02 µl-es skálával • Egy- vagy többcsatornás pipetta 0,1 µl-es, 0,2 µl-es vagy 0,5 µl-es skálával • Egy- vagy többcsatornás pipetta 1 µl-es vagy 2 µl-es skálával A pipettákat rendszeresen kalibrálni kell, és pontosságuknak a megadott térfogat 5%-án belül kell lennie.	Általános laboratóriumi beszállító
Pipettázó feltét	Általános laboratóriumi beszállító
Jég- vagy hidegblokk	Általános laboratóriumi beszállító
10 ml-es szerológiai pipetták	Általános laboratóriumi beszállító
Ragasztólemezek a 96 üregű lemezekhez a következő jellemzőkkel: <ul style="list-style-type: none"> • Lehúzható • Szoknyás vagy félszoknyás PCR lemezekhez alkalmas • Erős ragasztóanyag, amely ellenáll a -20 °C és 100 °C közötti többszöri hőmérsékletváltozásnak • DNáz-/RNáz-mentes 	Általános laboratóriumi beszállító
1,7 ml-es kapacitású mikrocentrifuga-csővek, nukleázmentesek	Általános laboratóriumi beszállító
Nukleázmentes reagenstartályok (eldobható csatorna, 50 ml) (vagy azzal egyenértékű)	Általános laboratóriumi beszállító
15 ml-es kúpos kémcsövek	Általános laboratóriumi beszállító

Berendezés	Beszállító
50 ml-es kúpos kémcsövek	Általános laboratóriumi beszállító
Kompatibilis aeroszolálló pipettahegyek	Általános laboratóriumi beszállító
96 üregű tárolólemezek, 0,8 ml (MIDI-lemezek)	Fisher Scientific, cikkszám: AB-0859 vagy azzal egyenértékű
96 cellás PCR-lemezek, hőciklus-szabályozókkal kompatibilisek, 0,2 ml (polipropilén cellák)	Általános laboratóriumi beszállító

Amplifikáció utáni berendezések és anyagok

Berendezés	Beszállító
NextSeq 550Dx készülék	Illumina, cikkszám: 20005715
Lemezcentrifuga a következő jellemzőkkel: <ul style="list-style-type: none"> • Kompatibilis a 96 üreges mikrolemezekkel • Képes 280 x g-re (+/- 10%) 	Általános laboratóriumi beszállító
Hőváltóztató inkubátor a következő jellemzőkkel: <ul style="list-style-type: none"> • Fűtött fedél (100 °C) • 4 °C—99 °C hőmérséklettartományt foglal magában • ±0,25 °C hőmérsékletpontosság • Kompatibilis a 96 üregű, 0,2 ml-es PCR-lemezekkel • Lásd: Hőciklus-szabályozó felfutási sebessége a(z) 23. oldalon 	Általános laboratóriumi beszállító
Kémcsőkeverő	Általános laboratóriumi beszállító
Mikrominta-inkubátorok betéttel a 96 cellás MIDI-lemezekhez	Általános laboratóriumi beszállító
Száraz hőblokk a következő specifikációkkal: <ul style="list-style-type: none"> • 25 °C - 99 °C hőmérséklettartomány • ±5 °C hőmérsékletpontosság • Ellenőrizze, hogy a mikrocentrifuga-csővek kompatibilisek-e a hőblokkal 	Általános laboratóriumi beszállító
Lemezrázó a következő jellemzőkkel: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm-es körpálya • Rázatható 1200 fordulat/perc és 1800 fordulat/perc sebességgel 	Általános laboratóriumi beszállító
Mikrocentrifuga	Általános laboratóriumi beszállító

Berendezés	Beszállító
Tömítő ék vagy görgő	Általános laboratóriumi beszállító
Mágneses állvány a következő specifikációkkal: <ul style="list-style-type: none"> • Paramágneses gyöngylecsapáshoz/elválasztáshoz tervezve • Mágnesek az állvány oldalán (nem az alján) • Kompatibilis a 96 üreges MIDI-lemezekkel 	Általános laboratóriumi beszállító
A 2 µl és 1000 µl közötti térfogat pontos leadására alkalmas precíziós pipetták a következő specifikációkkal: <ul style="list-style-type: none"> • Egy- vagy többcsatornás pipetta 0,02 µl-es skálával • Egy- vagy többcsatornás pipetta 0,1 µl-es, 0,2 µl-es vagy 0,5 µl-es skálával • Egy- vagy többcsatornás pipetta 1 µl-es vagy 2 µl-es skálával A pipettákat rendszeresen kalibrálni kell, és pontosságuknak a megadott térfogat 5%-án belül kell lennie.	Általános laboratóriumi beszállító
Pipettázó feltét	Általános laboratóriumi beszállító
10 ml-es szerológiai pipetták	Általános laboratóriumi beszállító
Ragasztólemezek a 96 üregű lemezekhez a következő jellemzőkkel: <ul style="list-style-type: none"> • Lehúzható • Szoknyás vagy félszoknyás PCR lemezekhez alkalmas • Erős ragasztóanyag, amely ellenáll a -20 °C és 100 °C közötti többszöri hőmérsékletváltozásnak • DNáz-/RNáz-mentes 	Általános laboratóriumi beszállító
2 ml-es kapacitású mikrocentrifuga-csővek, nukleázmentesek	Általános laboratóriumi beszállító
1,7 ml-es kapacitású mikrocentrifuga-csővek, nukleázmentesek	Általános laboratóriumi beszállító
Nukleázmentes reagenstartályok (eldobható csatorna, 50 ml vagy azzal egyenértékű)	Általános laboratóriumi beszállító
15 ml-es kúpos kémcsövek	Általános laboratóriumi beszállító
50 ml-es kúpos kémcsövek	Általános laboratóriumi beszállító
Kompatibilis aeroszolálló pipettahegyek	Általános laboratóriumi beszállító

Berendezés	Beszállító
96 üregű tárolólemezek, 0,8 ml (MIDI-lemezek)	Fisher Scientific, cikkszám: AB-0859 vagy azzal egyenértékű
96 cellás PCR-lemezek, hőciklus-szabályozókkal kompatibilisek, 0,2 ml (polipropilén cellák)	Általános laboratóriumi beszállító
Jég- vagy hidegblokk	Általános laboratóriumi beszállító

Ultraszonikátor konfigurációs beállítások DNS-fragmentációhoz

A DNS fragmentálása vagy vágása befolyásolja a vizsgálat teljesítményét a fragmentum méretének meghatározásával, ami pedig befolyásolja a szekvenálási lefedettséget. A TSO Comprehensive (EU) vizsgálatra több fókuszált ultrahangos konfigurációt értékelték és optimalizáltak (4. táblázat).

- A vágási időt úgy állították be, hogy maximalizálja a MEDIAN_EXON_COVERAGE mérőszámot, amelyet az [Minőség-ellenőrzés a\(z\) 80. oldalon](#) ismertet. A vágási idők (lásd 4. táblázat) és a MEDIAN_INSERT_SIZE eredmények a konfigurációk között különböztek.
- Az 1–4. és 6. konfigurációt 8 csíkos üvegcsövekkel tesztelték. Az 5. konfiguráció esetén egyetlen üvegcsövet használtak. A cső térfogatkapacitása a 4. táblázat látható.
- A 3–6. konfiguráció (kisebb vízfürdő-térfogat) optimalizálása pulzálást használt.
- A 3–5. konfigurációt kisebb térfogatú csövekben metszték. A cső térfogata befolyásolja a vágási paramétereket.
- A 4. konfiguráció (vezetékes jelátalakító, közepes méretű vízfürdő-térfogat, gáztalanított víz) hosszú impulzuskésleltetési időt igényelt (40 másodperc) az 1. és 2. konfigurációhoz hasonló MEDIAN_EXON_COVERAGE eredmény eléréséhez névleges 40 ng-s bemenetnél.
- A 3. konfiguráció optimális beállításai kissé nagyobb fragmentumméret-eloszlást eredményeztek a többi konfigurációhoz képest (a MEDIAN_INSERT_SIZE körülbelül 5–10 bázispárral volt nagyobb).
- A 3. és 5. konfigurációban gázmentes vizet és a legkisebb vízfürdő-térfogatot használták.
- A 3. és 5. konfigurációban megnövelt DNS-bemenetre volt szükség (50 ng a 3. konfigurációhoz, 60 ng az 5. konfigurációhoz) ahhoz, hogy hasonló MEDIAN_EXON_COVERAGE eredményt érjenek el a másik 4 konfigurációhoz képest, amelyek a névleges 40 ng bemenetet használták.
- A 3. és 5. konfiguráció nagyobb kárt és/vagy denaturációt okoz, ezért a könyvtárkészítéshez felhasználható dsDNS-molekulák effektív tömege csökken.

Centrifugálja a vágási csöveket a visszanyerési folyamat során, hogy a megadott térfogatot visszanyerje, mivel az anyagvesztés hátrányosan befolyásolhatja a teljesítményt.

4. táblázat Kiértékelt fókuszált ultrasonikátor konfigurációk

Paraméter	Konfiguráció					
	1	2	3	4	5	6
Transzducer	Vonal	Pont	Pont	Vonal	Pont	Vonal
Vízfürdő térfogata	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Víz, gázmentesített	Igen	Igen	Nem	Igen	Nem	Igen
Vízhűtő	Igen	Igen	Igen	Igen	Igen	Igen
Vízfürdő hőmérséklete	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Csúcsesemény- teljesítmény (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
%-os üzemi tényező	30	10	30	25	20	25
Ciklusok sorozatonként	200	200	1000	1000	1000	600
Pulzálás (10 mp-es sorozatok)	Nem	Nem	Igen	Igen	Igen	Igen
Pulzálási késleltetési idő	NA	NA	10 s	40 s	10 s	10 s
Vágási idő	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Mintafeldolgozás	1 – 8	1	1	1 – 8	1	1 – 8
Köteg mérete	1 – 96	1 – 96	1 – 8	1 – 8	1	1 – 96
Üveg nyolccsíkós kémcső mintamérete	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Egy cső (50 µl)	130 µl (vagy 96 mikroTUBE- lemez)
Ingadozás	NA	NA	NA	3 mm Y @ 20 mm/s	NA	1,5 mm Y @ 10 mm/s
DNS-bemeneti ekvivalens (medián exonlefedettséghez)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ A 200 másodperces vágási idő 10 másodperces sorozatokból áll, 20 ismétléssel.

² A 320 másodperces vágási idő 10 másodperces sorozatokból áll, 32 ismétléssel.

Hőciklus-szabályozó felfutási sebessége

A hőciklus felfutási sebessége befolyásolja a vizsgálat QC-mutatóit (Felhasználható MSI-helyszínek, medián tartálysám CNV-célpont, medián inszerció méret (RNS)), valamint támogatja a splice-variánsok és fúziók leolvasását. A hőciklus-szabályozó felfutási sebességének optimalizálása ajánlott. Például egy tesztelt modellt

5 °C/s és 3 °C/s közötti alapértelmezett (és maximális) felfutási sebességről módosítottak, hogy összehasonlítható eredményeket kapjanak az alacsonyabb alapértelmezett felfutási sebességgel rendelkező többi modellhez képest.

Mintavétel, -szállítás és -tárolás

A minták levétele, szállítása, tárolása és feldolgozása során kövesse a standard eljárásokat.

A mintákkal kapcsolatos követelmények

FFPE-szövet

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálathoz 40 ng RNS-re és/vagy 40 ng FFPE-szövetből kivont DNS-re van szükség. Az RNS és a DNS egyaránti használata lehetővé teszi az összes variánstípus elemzését. A szövetet molekuláris elemzésekhez alkalmas formalinos fixálóval kell fixálni (például 10%-os semleges pufferelt formalin). A szövetet nem szabad dekalcifikálni. A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat elvégzése előtt a szövetmintát patológusnak kell megvizsgálnia, hogy meggyőződjön arról, hogy az megfelelő-e ehhez a vizsgálathoz. Legalább 20%-os tumortartalom szükséges (területenként) a szomatikus drive mutációk kimutatásához. Az MSI-státusz több mintában történő megbízható kimutatásához legalább 30%-os tumortartalom szükséges. Ha egy mintát kevesebb, mint 30%-os tumortartalommal tesztelnek más variánstípusok kimeneteleinek meghatározásához, akkor az MSI-stabil eredmény megbízhatatlan lehet. Az MSI-magas eredmény a tumortartalomtól függetlenül helyes.

A génamplifikációk és RNS-variánsok tumortartalma az amplifikáció és a fúziós expresszió mértékétől függ (lásd: [Tumor tartalma a\(z\) 104. oldalon.](#))

A 40 ng RNS és 40 ng DNS különböző szolid szövettípusokból történő kivonása nagy valószínűségének biztosítása érdekében az ajánlott szövettérfogat $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Ez a térfogat megfelel egy $\geq 200 \text{ mm}^2$ kumulatív felületű életképes szövetterületnek 5 μm vastag metszetek esetén, vagy egy $\geq 100 \text{ mm}^2$ felületnek 10 μm vastag metszetek esetén. A kumulatív szövetterület az életképes szövetterület összessége az extrakcióra beküldött összes metszetben. Például 200 mm^2 kumulatív szövetterület érhető el négy 5 μm -es metszetből 50 mm^2 -es szövetterülettel vagy öt 10 μm -es metszetből 20 mm^2 -es szövetterülettel. A szövetelhalás csökkentheti a nukleinsavhozam mennyiségét. Az álnegatív eredmények lehetőségének minimalizálásához a szövetben makrodisszekcióval érhető el a kívánt életképes tumortartalom.

A nagy mennyiségű (területenként $\geq 23\%$) nekrotikus szövet befolyásolhatja a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat azon képességét, hogy kimutassa a génamplifikációkat és az RNS-fúziókat. Ha a mintametszet a teljes szövetterületen több mint 23% nekrotizist tartalmaz, akkor makrodisszekciót kell végezni a nekrotikus szöveten. Ha a laboratórium RNS-t futtat a vizsgálattal, akkor kerülni kell, illetve minimalizálni kell a hemoglobinnal rendelkező szövetet, amikor szeleteket nyerne ki a szövetblokkból. Lásd: [Zavaró anyagok a\(z\) 95. oldalon.](#)

A tárgylemezre helyezett FFPE-szövet szobahőmérsékleten legfeljebb 28 napig tárolható.

Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás

- Az RNS-t és a DNS-t FFPE-szövetmintákból nyerje ki kereskedelmi forgalomban kapható extrakciós készletek segítségével. Az extrakciós készletek különbségei befolyásolhatják a teljesítményt. Lásd a [Nukleinsav-extrakciós készlet értékelése a\(z\) 93. oldalon](#).
- Ne növelje a proteináz K-t vagy az azzal egyenértékű enzimet az extraháló készletben biztosított standard koncentrációból történő extrahálás során. Lásd: [Zavaró anyagok a\(z\) 95. oldalon](#).
- Tárolja az extrahált törzsnukleinsavat az extrakciós készlet gyártójának utasításai szerint.
- Az extrahált DNS-t legfeljebb 28 napig tárolja -25 °C és -15 °C között.
- Az extrahált RNS-t legfeljebb 28 napig tárolja -85 °C és -65 °C között.
- A koncentráció időbeli változásának elkerülése érdekében mérje meg a DNS-t és az RNS-t a könyvtár előkészítésének megkezdése előtti 28 napon belül. Határozza meg az RNS és a DNS mennyiségét fluorometriás mennyiségi meghatározási módszerrel, amely nukleinsavkötő festékeket használ. A nukleinsav koncentrációjának legalább három mérés átlagának kell lennie.
- A vizsgálathoz 40 ng szükséges minden egyes RNase/DNasef-free water (nincs biztosítva) segítségével előkészített RNS-mintából, 8,5 µl (4,7 ng/µl) végső térfogattal.
- A vizsgálathoz 40 ng szükséges minden egyes gDNS-mintából, legalább 3,33 ng/µl extrakciós koncentrációval. A metszéshez 52 µl (0,77 ng/µl) végső térfogatra van szükség, legalább 40 µl TEB-vel (mellékelve) hígítószerként használva.

Könyvtár tárolása

Tárolja a könyvtárakat alacsony kötésű PCR lemezeken 7-32 napig, a könyvtár típusától függően (lásd: [5. táblázat](#)).

5. táblázat Könyvtártárolási idők

Könyvtár típusa	Lemez	Napok száma	Tárolási hőmérséklet
cDNS	PCF PCR	≤ 7	-25 °C és -15 °C között
Fragmentált gDNS	LP PCR	≤ 7	-25 °C és -15 °C között
Dúsítás előtt	ALS PCR	≤ 30	-25 °C és -15 °C között
Dúsítás után	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C és -15 °C között

Könyvtár típusa	Lemez	Napok száma	Tárolási hőmérséklet
Dúsítás utáni PCR	PL PCR	≤ 30	-25 °C és -15 °C között
Normalizált	NL PCR	≤ 32	-25 °C és -15 °C között

Figyelmeztetések és óvintézkedések

Biztonság



VIGYÁZAT!

Ezek a reagensek potenciálisan veszélyes vegyszereket tartalmaznak. Belélegzésük, lenyelésük, bőrrel való érintkezésük és szembe kerülésük esetén sérülést okozhatnak. A szellőzésnek megfelelőnek kell lennie a reagensekben lévő veszélyes anyagok kezeléséhez. Viseljen védőfelszerelést, azaz védőszemüveget, kesztyűt és laborköpenyt a kockázat mértékének megfelelően. A használt reagenseket vegyi hulladékként kezelje, és a regionális, országos és helyi törvényeknek és előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa. További környezetvédelmi, egészségügyi és biztonsági információkért tekintse meg a következő címen elérhető biztonsági adatlapot: support.illumina.com/sds.html.

- Minden mintát úgy kell kezelni, mintha ismertén fertőző lenne.
- Használja a rutinszerű laboratóriumi óvintézkedéseket. Ne pipetázzon szájjal. Ne étkezzon, igyon vagy dohányozzon a munkaterületként megjelölt területeken. A minták és a vizsgálati reagensek kezelésekor viseljen eldobható kesztyűt és laborköpenyt. A minták és a vizsgálati reagensek kezelését követően alaposan mosson kezet.

Laboratórium

- A szennyeződés megelőzése érdekében egyirányú munkafolyamattal rendezze a laboratóriumot. Az amplifikáció előtti és az amplifikáció utáni területeken külön készülékeknek és anyagoknak kell lenniük (például pipetták, pipettahegyek, vortex keverő és centrifuga). Az amplifikációs termék vagy a szonda átvitelének megelőzése érdekében ne térjen vissza az előamplifikációs területre, miután belépett az utóamplifikációs területre.
- Az amplifikációs termék átvitelének megelőzése érdekében az amplifikáció utáni területen hajtsa végre az index PCR és dúsítás lépéseket.

- A könyvtárelőkészítési eljárások RNáz-/DNáz-mentes környezetet igényelnek. Alaposan fertőtlenítse a munkaterületeket RNáz-/DNáz-gátló tisztítószerrel. Használjon DNáz-, RNáz- és humán genomikai DNS-mentesnek minősített műanyagokat.
- Az amplifikáció utáni eljárásokhoz minden eljárás előtt és után alaposan tisztítsa meg a munkafelületeket és a berendezéseket frissen készített 0,5%-os nátrium-hipoklorit- (NaOCl) oldattal. Hagyja, hogy az oldat 10 percig érintkezzen a felületekkel, majd alaposan törölje tisztára 70%-os etil- vagy izopropil-alkohollal.
- Használjon nukleázmentes mikrocentrifuga-csőveket, lemezeket, pipettahegyeket és tartályokat.
- Használjon kalibrált berendezést a vizsgálat során. Ügyeljen arra, hogy a berendezést a jelen protokollban megadott sebességekre, hőmérsékletekre és térfogatokra kalibrálja.
- Használjon precíziós pipettákat a reagensek és minták pontos adagolásának biztosításához. Rendszeresen kalibráljon a gyártó előírásainak megfelelően.
- Többcsatornás pipetták használatakor kövesse az alábbi útmutatásokat:
 - Pipetázzon legalább $\geq 2 \mu\text{l}$ -t.
 - Győződjön meg arról, hogy a zárókupakok jól illeszkednek és megfelelőek a többcsatornás pipetta márkájához és modelljéhez.
 - Gördülő mozdulattal rögzítse a hegyeket, hogy minden hegy egyformán jól rögzüljön.
 - Szívjon fel 90° -os szögben azonos mennyiségű folyadékot minden hegyen.
 - A beadás után keverje össze az összes komponenst a reakcióelegy fel-lepipettázásával.
 - Az adagolás után győződjön meg arról, hogy a folyadék minden hegyből teljesen kiadagolásra került.
- Győződjön meg arról, hogy a vizsgálatához meghatározott berendezést használja, és a programokat az utasításoknak megfelelően állítja be.
- A hőciklus-szabályozó és a mikrominta-inkubátor megadott hőmérsékletei reakcióhőmérsékletet jeleznek, nem szükségszerűen a berendezés beállított hőmérsékletét.

Vizsgálat

- Kerülje el a keresztszennyeződést.
 - A minták és reagensek kezelése során kövesse a megfelelő laboratóriumi gyakorlatokat.
 - Az egyes minták között és az egyes reagensek között használjon új laboratóriumi fogyóeszközöket és új pipettahegyeket.
 - Használjon aeroszolrezisztens pipettahegyeket a keresztszennyeződésének megakadályozására.
 - Használjon egyirányú munkafolyamatot, amikor az előamplifikációs területről az utóamplifikációs területre lép.
 - Egyszerre csak egy indexprimert nyisson ki és kezeljen. Használat után azonnal tegye vissza a kupakot mindegyik indexcsőre. A készlet extra kupakokat tartalmaz.
 - Gyakran cseréljen kesztyűt, ha az indexprimerekkel vagy mintákkal érintkezik.
 - Távolítsa el a fel nem használt index primer csöveket a munkaterületről.

- Ne tegye vissza a reagenseket a készletcsövekbe, miután azokat sávcsővel, csatornával vagy tartállyal használta.
- Keverje össze a mintákat pipettával, illetve centrifugálja a lemezt, ha az van megadva.
- Használjon mikrolemez-rázógépet. Ne vortexelje a lemezeket.
- Ne használjon különböző tételbe tartozó reagenskészlet-komponenseket. A reagenskészlet-tételeket a reagenskészlet dobozának címkéje és a törzstétellap azonosítja.
- Megfelelő laboratóriumi gyakorlat szükséges annak megelőzéséhez, hogy a nukleázok és PCR-termékek szennyezzék a reagenseket, az eszközöket, a mintákat és a könyvtárakat. A nukleázokkal és PCR-termékekkel való szennyeződés pontatlan és megbízhatatlan eredményeket okozhat.
- Az optimális vizsgálati teljesítményhez és tároláshoz megfelelő lemeztípus szükséges. Mindenképpen kövesse a lemezátvitelre vonatkozó utasításokat a [Használati útmutató a\(z\) 38. oldalon](#)
- Az eljárások leírtaktól eltérő módon történő végrehajtása hibás eredményeket eredményezhet, vagy jelentősen csökkentheti a könyvtár minőségét.
- A felsorolt műveleteket közvetlenül egymás után kell elvégezni; csak a [Használati útmutató a\(z\) 38. oldalon](#) megjelölt biztonságos megszakítási pontoknál lehet abbahagyni.
- A vizsgálat reagenseit és összetevőit a megadott hőmérsékleten, a kijelölt amplifikáció-előtti vagy amplifikáció-utáni területen tárolja.
- Ne tárolja a reagenseket fagymentes tárolóegységben vagy hűtőszekrényajtó-rekeszekben.
- Ne fagyassza le a gyöngyöket tartalmazó reagenseket (LNB1, SPB és SMB).
- Ne használjon nem megfelelően tárolt reagenseket.
- Ne térjen el az egyes reagensekhez megadott keverési és kezelési eljárásoktól. A reagensek nem megfelelő keverése vagy vortex keverővel történő túlzott keverése sikertelen mintaeredményeket eredményezhet.
- Az FSM, SSM, ERA1-B és TCB1 tartalmazhat termékekhez kapcsolódó részecskéket. Kövesse az egyes reagensek kezelésére vonatkozó irányelveket. Az FSM- és SSM-keverési lépések elvégzése után a visszamaradó fehér, termékkel kapcsolatos részecskék nem befolyásolják a teljesítményt.
- Készítsen friss törzselegyeket, és használat után dobja ki a maradék térfogatot.
- Mindig készítsen friss 80%-os etanolt RNase/DNase-free waterrel a mosási lépésekhez. Az etanol vizet vehet fel a levegőből, ami befolyásolhatja az eredményeket. Használat után ártalmatlanítsa a 80%-os etanolt a helyi, állami és/vagy szövetségi előírásoknak megfelelően.
- Vigye át az eluátum megadott térfogatát. Ha az elúciós lépések során a megadott térfogatnál kevesebb eluátumot visz át, az befolyásolhatja az eredményeket.
- Az ultrasonikátorokhoz kövesse az alábbi útmutatásokat. Mindenképpen kövesse a gyártó utasításait.
 - Lassan töltsé be a gDNS-t az ultrasonikátor-csőbe, hogy elkerülje a buborékok kialakulását. A túlzott mennyiségű buborék vagy a nyírőcsőben lévő légrés nem teljes fragmentációt eredményezhet.
 - Lassan adagolja az ultrasonikátor-csővekbe, és kerülje a kifröccsenést.

- A folyadék elmozdulásának és a minta elvesztésének elkerülése érdekében ne helyezze a pipettahegyet az ultraszonikátor-cső aljára, amikor eltávolítja a fragmentált DNS-t.
- Ne pipettázzon 2 µl-nél kevesebb mintabemenetet.
- Ne használjon csatornát a reagensek adagolására olyan lépésekhez, amelyekhez 10 µl-nél kevesebb anyagot kell hozzáadni minden egyes mintahelyhez.
- Használjon finom hegyű pipettát, amikor fragmentált gDNS-mintákat visz át az ultraszonikátor-csővekből a Library Prep (LP) lemezre.
- A SUA1 és az UMI adapterek együttes használata tilos.
- Használjon SUA1 adaptereket RNS-mintáknál.
- Használjon UMI adaptereket DNS-mintákkal.
- Rendeljen különböző indexprimereket minden könyvtármintához, hogy egyedileg azonosíthassa az egyes könyvtárakat, amikor azok egyetlen áramlásos cellán végzett szekvenáláshoz vannak összevonva.
- Ne kombinálja a CPxx és UPxx indexprimereket ugyanabban a könyvtárban.
- A minták és az indexelő primerek közötti eltérések hibás eredményjelentést okoznak a pozitív mintaazonosítás elvesztése miatt. A könyvtárelőkészítés megkezdése előtt adja meg a mintaazonosítókat, és rendeljen hozzá indexeket a Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul-ban. Rögzítse a mintaazonosítókat, az indexelést és a lemezcellák tájolását referenciaként a könyvtár előkészítése során.
- Az RNS-mintákból származó könyvtárakhoz csak UPxx indexeket használjon.
- A DNS-mintákból származó könyvtárakhoz UPxx indexeket vagy CPxx indexeket használjon.
- Szekvenáljon maximum 8 RNS könyvtárat és 8 DNS-könyvtárat áramlási cellánként. Legalább három könyvtár szekvenálása. Kövesse a [Könyvtárak száma és indexek kiválasztása a\(z\) 34. oldalon](#).
- Miután az [Első célok rögzítése a\(z\) 59. oldalon](#) és a [Második célok rögzítése a\(z\) 63. oldalon](#) a kötési lépés megtörtént, azonnal lépjen a mosási lépésre, hogy megelőzze a gyöngypelletek kiszáradását.
- A mosási lépések során távolítsa el az összes 80%-os etanolt a cellák aljából. Kimutatták, hogy a maradék etanol befolyásolja az eredményeket.
- Az optimális vizsgálati teljesítmény érdekében kövesse a [Használati útmutató a\(z\) 38. oldalon](#).
- [Könyvtárak normalizálása a\(z\) 70. oldalon](#) ismertetett eljárás során alaposan szuszpendálja újra a könyvtári gyöngypelletet, hogy az áramlási cellán konzisztens klasztersűrűséget kapjon.
- A termékkel kapcsolatos súlyos eseményeket haladéktalanul jelentse az Illumina vállalatnak és a felhasználó és a páciens lakhelye szerinti tagállamok illetékes hatóságainak.

Az eljárással kapcsolatos megjegyzések

- A TSO Comprehensive (EU) munkafolyamat a következő ütemezés szerint végezhető el:

- 1. nap: cDNS-szintézis RNS-mintákból, gDNS-minták DNS-fragmentációja, könyvtár előkészítése és éjszakai (első) hibridizáció megkezdése.
- 2. nap: Dúsítás, dúsított könyvtárak normalizálása és könyvtárak betöltése a NextSeq 550Dx készülékre.

Ha a TSO Comprehensive (EU) munkafolyamat végrehajtása nem lehetséges ezen ütemezés szerint, akkor a protokollban több biztonságos leállási pont van meghatározva. A felsorolt műveleteket közvetlenül egymás után kell elvégezni; csak a protokollban megjelölt biztonságos megszakítási pontoknál lehet abbahagyni.

- Az RNS- és DNS-mintákból származtatott könyvtárak egyidejűleg külön cellákban is elkészíthetők.
- A törzselegy-előkészítési táblázatok tartalmazzák a térfogattöbbletet annak biztosítása érdekében, hogy elegendő térfogat álljon rendelkezésre a feldolgozott minták számához.
- Használjon nukleázoktól mentes, molekuláris minőségű vizet.
- A reagens hozzáadása után öblítse le a hegyet úgy, hogy egyszer felszívja és a lemez megfelelő cellájába engedi ki, hacsak az eljárás másként nem rendelkezik.
- A szobahőmérséklet a 15 °C és 30 °C közötti hőmérsékletet jelenti.
- A reagenseket, mintákat és könyvtárakat hűtve kell tárolni a használati utasítás bizonyos lépéseinél. Ez jégen vagy azzal egyenértékű hideg forráson való tárolásként határozható meg.

Hőciklus-szabályozó programok

- Programozza a hőciklus-szabályozó programokat az elő- és utóamplifikáló berendezéseken a protokoll megkezdése előtt.
- Győződjön meg arról, hogy a PCR-lemezek szorosan illeszkednek a hőciklus-szabályozóba.
- Használja a hőciklus-szabályozó gyártója által ajánlott lemezeket.

A lemez zárófoliával ellátása és a zárófolia eltávolítása

- A lemezeket mindig új öntapadós lemeztömítéssel zárja le. Ne használja újra a tömítéseket.
- A lemez lezárásához biztonságosan ragassza fel a ragasztós borítást a lemezre egy tömítőékkel vagy hengerrel.
- A 96 cellás lemezt mindig új ragasztós lemezzel zárja le, mielőtt a protokoll következő lépéseit végrehajtaná:
 - Lemezrázási lépések
 - Centrifugálási lépések
 - Hőmérséklet-változtatási lépések
 - Hibridizációk
 - Hosszú távú tárolás

- A keresztszennyeződés és a párolgás kockázatának csökkentése érdekében győződjön meg arról, hogy a szélek és a cellák zártan tömítve vannak.
- Helyezze a lemezt vízszintes felületre, és lassan húzza le a zárófóliát.
- A lezárás megszüntetése előtt, ha bármilyen folyadék vagy páralecsapódás figyelhető meg a lemezcellák tömítésén vagy oldalfalain, centrifugálja 280g erővel 1 percig.
- Használjon -20 °C és 100 °C közötti hőmérsékleten hatékony, szoknya vagy félszoknya PCR-lemezPCR-lemezekhez alkalmas öntapadós lemeztömítéseket.

Berendezés

- A vizsgálat megkezdése előtt győződjön meg arról, hogy a laboratóriumi személyzet ismeri a gyártó utasításait az összes berendezés kezelésére és karbantartására vonatkozóan.

Lemeztípus és lemezátvitelek

- Az optimális vizsgálati teljesítményhez és tároláshoz megfelelő lemeztípus szükséges.
- Amikor térfogatokat visz át a lemezek között, vigye át a megadott térfogatot a lemez minden egyes cellájából a céllemez megfelelő cellájába.
- A többcsatornás pipetták akkor használhatók, ha a mintákat kémcsőcsíkok vagy lemezek között helyezi át.
- A lemezek rázásakor kövesse az alábbi útmutatásokat.
 - Használjon lemezrázót a lemezek rázásához. Ne keverje a lemezeket vortex keverővel.
 - Rázza a PCR-lemezeket 1200 fordulat/perc sebességgel.
 - Rázza a MIDI-lemezeket 1800 fordulat/perc sebességgel.
 - Kövesse a gyártó utasításait, hogy a lemezrázó biztosan tartsa a lemezt.

Centrifugálás

- Amikor a protokollban szereplő utasítások azt jelzik, hogy rövid ideig centrifugáljon, centrifugálja 280g erővel 1 percig.
- Ha folyadék figyelhető meg a tömítésen vagy az üreg oldalán, centrifugálja a lemezt 280g erővel 1 percig.

Reagensek kezelése

- Használat után azonnal szorosan zárja vissza az összes reagenscsövet a párolgás korlátozása és a szennyeződés megelőzése érdekében.
- Tegye vissza a reagenseket a megadott tárolási hőmérsékletre, amikor már nincs rájuk szükség egy eljáráshoz.
- Kövesse a [Használati útmutató a\(z\) 38. oldalon](#) egyes eljárási szakaszait megelőző reagens-előkészítést.
- Ügyeljen arra, hogy a feldolgozott minták számához szükséges mennyiségű törzselegyet, elúciós keveréket és 80%-os etanolt készítse elő.

- A törzselegyen és az oldattáblázatokban megadott mennyiségek többletet tartalmaznak. A többlettérfogat kiszámítása a következő.
 - **14. táblázat**
 - Az FSM térfogata = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{minták száma} + \text{kontrollok}) \times (1,25)$.
 - Az RVT térfogata = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{minták száma} + \text{kontrollok}) \times (1,25)$.
 - **21. táblázat**
 - Az ERA1-B térfogata = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (1,20)$.
 - Az ERA1-A térfogata = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (1,20)$.
 - **29. táblázat**
 - Az EE2 térfogata = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (1,364)$.
 - HP3 térfogata = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (1,364)$.
 - **30. táblázat**
 - Az EE2 térfogata = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (1,364)$.
 - HP3 térfogata = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (1,364)$.
 - **36. táblázat**
 - LNA1 térfogata = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (2,0)$.
 - LNB1 térfogata = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (2,0)$.
 - **37. táblázat**
 - EE2 térfogata = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (1,25)$.
 - HP3 térfogata = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{könyvtárak száma}) \times (1,25)$.

Adapterkészletek

- A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat SUA1 és UMI adaptereket tartalmaz.
- Az SUA1 adapterek RNS-mintákkal használhatók. DNS-mintákkal nem használhatók.
- Az UMI adapterek DNS-mintákkal használhatók. RNS-mintákkal nem használhatók.

Gyöngyök kezelése

- A TSO Comprehensive (EU) teszt háromféle gyöngyöt tartalmaz (SPB, SMB és LNB1). Ügyeljen arra, hogy az eljárás során a megfelelő gyöngytípust használja.
- Végezze el a megfelelő számú mosást minden gyöngytípushoz.
- Használat előtt ellenőrizze, hogy a gyöngyök szobahőmérsékletűek-e.
- Használat előtt keverje a gyöngyöket 1 percig a homogenitás biztosítása érdekében.

- A gyöngyök pipettával történő összekeverésekor kövesse az alábbi útmutatásokat:
 - Használjon megfelelő pipetta- és hegyméretet a keverendő térfogathoz.
 - Állítsa be a térfogatot a minta térfogatának körülbelül 50–75%-ára.
 - Lassan pipettázzon anélkül, hogy elengedné a dugattyút.
 - Kerülje a kifröccsenést és a buborékok bejutását.
 - Helyezze a pipettahegyet a pellet fölé, és közvetlenül a pelletbe adagolja, hogy a gyöngyöket kiengedje a cellából vagy a csőből.
 - Győződjön meg arról, hogy a gyöngypellet teljesen az oldatban van. Az oldatnak sötétbarnának és homogén állagúnak kell lennie.
 - Értékelje, hogy van-e gyöngypellet. Óvatosan szívja fel a cella teljes gyöngyoldatát a hegygel, és nézze meg a cellák alját.
- Ha a mágneses szeparációs lépések során gyöngyöket szív fel a pipettahegyekbe, akkor a gyöngyöket adagolja vissza a mágneses állványon lévő lemezcellába. Várjon, amíg a folyadék tiszta lesz (körülbelül 2 perc), mielőtt továbblépne az eljárás következő lépésére.
- Gyöngyök mosásakor:
 - A lemezhez a javasolt mágneses állványt használja.
 - Adagolja a folyadékot közvetlenül a gyöngypelletre, hogy az üregek oldalán lévő gyöngyök nedvesek legyenek.
 - Tartsa a lemezt a mágneses állványon, amíg az eljárás meg nem határozza az eltávolítását.
 - Ne rázza a lemezt a mágneses állványon.
 - A mágneses állványon ne zavarja fel a gyöngypelletet.
- Gyöngyök mosásakor vagy felülúszó eltávolításakor a pipettahegyeket az ürege cellák alján megdöntve távolítsa el, hogy elkerülje a vákuum létrehozását és az oldat behúzását a pipettahegy szűrőibe.

Könyvtárak száma és indexek kiválasztása

A futtatás beállítása előtt tervezze meg a mintakönyvtárak és mintaindexek számát a szekvenálási futtatáshoz. A következő mintaszám-útmutatások pozitív kontrollokat tartalmaznak, de kizárják a negatív/minta nélküli kontrollokat (NTC-eket). Az NTC-eket további mintaként kell hozzáadni a tervezett futtatáshoz.

A TSO Comprehensive (EU) esetében kövesse az [6. táblázat](#) és a [7. táblázat](#) útmutatásait az egy áramlási cellán szekvenálendő RNS- és/vagy DNS-könyvtárak számának meghatározásához. Lásd: [6. táblázat](#), ha az RNS- vagy DNS-könyvtárakat külön szekvenálja. Lásd: [7. táblázat](#), ha az RNS- és DNS-könyvtárakat ugyanazon az áramlási cellán szekvenálja.

6. táblázat RNS- vagy DNS-könyvtárak szekvenálása

Könyvtár típusa	Minimum*	Maximum*
Csak RNS	3	16
Csak DNS	3	8

* Az NTC-k nem járulnak hozzá a plexitáshoz.

7. táblázat RNS- és DNS-könyvtárak szekvenálása ugyanazon az áramlási cellán

Könyvtár típusa	Minimum*	Maximum*
RNS	3	8
DNS	3	8

* Az NTC-k nem járulnak hozzá a plexitáshoz.

A reagens *optimális* használatához a DNS- és RNS-könyvtárak TSO Comprehensive (EU) használatával történő szekvenálásakor a NextSeq 550Dx műszeren, szekvenáljon 8 RNS-könyvtárat és 8 DNS-könyvtárat áramlási cellánként.

Az indexprimerek egyedileg azonosítják az egyes mintákat, így a könyvtárak összevonhatók egy áramlási cella szekvenálásához. A kompatibilis indexkombinációk megjelennek a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn a futtatás beállítása során itt: Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul. A könyvtár előkészítése során adja hozzá az indexprimert az egyes mintakönyvtárakhoz. *Minden mintakönyvtárhoz más indexprimer-keveréket használjon.*

Győződjön meg arról, hogy a mintákkal használt indexprimerek megegyeznek a Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul-vel történő elemzéshez kiválasztott indexekkel. *Az eltérések hibás eredményjelentést okoznak a pozitív mintaazonosítás elvesztése miatt.*

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálatban kétféle index van.

- **UPxx indexek**—Az UPxx indexeket RNS- vagy DNS-mintákból származó könyvtárakhoz használja.
- **CPxx indexek**—A CPxx indexeket DNS-mintákból származó könyvtárakhoz használja. Ne használja a CPxx indexeket RNS-ből származó könyvtárakhoz, vagy ha csak három DNS-könyvtár szekvenálására kerül sor.

Ha csak három könyvtárat szekvenál, a következő követelmények érvényesek:

- A könyvtáraknak teljes DNS-nek vagy RNS-nek kell lenniük.
- Ne használjon CPxx indexkészleteket.
- Az alábbi UPxx indexkészletek egyike szükséges a megfelelő diverzitás biztosításához.
 - UP01, UP02 és UP03
 - UP04, UP05 és UP06
 - UP07, UP08 és UP09
 - UP10, UP11 és UP12

Például az első könyvtár az UP01, a második könyvtár az UP02 és a harmadik könyvtár az UP03.

TruSight onkológia kontrollok

A TSO Comprehensive (EU) előfeltétele a TruSight onkológiai kontrollok megléte, amely a TruSight onkológia DNS-kontrollból és a TruSight onkológia RNS-kontrollból áll pozitív kontrollokként. Minden egyes DNS-szekvenálási futtatáshoz a TruSight onkológia DNS-kontrollt és egy adott könyvtárelőkészítési eseményen belül minden egyes RNS-szekvenálási futtatáshoz a TruSight onkológia RNS-kontrollt is tartalmazza (beleértve a kombinált DNS- és RNS-mérések kontrollokat is). Egyedi pozitív kontroll készül minden tervezett szekvenált futtatáshoz. További információkért lásd TruSight Onkológiai kontrollok terméktájékoztató (dokumentumszám: 200009919).

A pozitív kontroll beviteli mennyisége 40 ng a DNS és RNS esetén.

Minden egyes RNS- és DNS-könyvtárelőkészítési eseményben a megfelelő NTC-t szerepeltetni kell. Az NTC egy könyvtárelőkészítési eseményen belül ismételt sorba rendeződik. Kövesse az alábbi útmutatókat a TruSight onkológiai kontrollokhoz:

- A mintákhoz hasonlóan készítsen elő könyvtárakat a pozitív kontrollokról és a sablon nélküli kontrollokról.
- Használjon TEB-et a DNS NTC-hez.
- Használjon DNáz-/RNáz-mentes vizet az RNS NTC-hez.
- A pozitív kontrollok a maximális könyvtári követelmény részét képezik.
- Az NTC-k nem szerepelnek a minimális könyvtári követelményben.
- Használja az UP indexeket az NTC-hez, amikor csak 3 könyvtárt szekvenál.
- Mivel az NTC ismételt sorozatban van, az ehhez a vezérlőhöz kiválasztott indexek nem ismételt meg a könyvtárelőkészítési eseményen.

Az alábbi táblázatok lemezrendezésekre mutatnak példákat a könyvtár előkészítéséhez. Minden számozott oszlop egyetlen szekvenálási futtatást jelöl. Amikor a DNS- és RNS-könyvtárakat együtt szekvenálásra használják, minden egyes oszlop egy szekvenálási futtatást képvisel (például 1. oszlop és 7. oszlop). Az NTC minden oszlophoz vagy oszlopkészlethez szekvenált.

8. táblázat Könyvtárelőkészítési esemény egy egyszeri futtatáshoz, hat betegmintával együtt

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pos DNS-kontroll	üres	üres	üres	üres	üres	Pos RNS-kontroll
B	DNS 1	üres	üres	üres	üres	üres	RNS 1
C	DNS 2	üres	üres	üres	üres	üres	RNS 2
D	DNS 3	üres	üres	üres	üres	üres	RNS 3
E	DNS 4	üres	üres	üres	üres	üres	RNS 4
F	DNS 5	üres	üres	üres	üres	üres	RNS 5
G	DNS 6	üres	üres	üres	üres	üres	RNS 6
H	DNS NTC	üres	üres	üres	üres	üres	RNS NTC

9. táblázat Három futtatás könyvtárelőkészítési eseménye, beleértve 20 betegmintát

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pos DNS-kontroll	Pos DNS-kontroll	Pos DNS-kontroll	üres	Pos RNS-kontroll	Pos RNS-kontroll	Pos RNS-kontroll
B	DNS 1	DNS 7	DNS 14	üres	RNS 1	RNS 7	RNS 14
C	DNS 2	DNS 8	DNS 15	üres	RNS 2	RNS 8	RNS 15
D	DNS 3	DNS 9	DNS 16	üres	RNS 3	RNS 9	RNS 16
E	DNS 4	DNS 10	DNS 17	üres	RNS 4	RNS 10	RNS 17
F	DNS 5	DNS 11	DNS 18	üres	RNS 5	RNS 11	RNS 18
G	DNS 6	DNS 12	DNS 19	üres	RNS 6	RNS 12	RNS 19
H	DNS NTC	DNS 13	DNS 20	üres	RNS NTC	RNS 13	RNS 20

Használati útmutató

A TSO Comprehensive (EU) munkafolyamat áttekintése az [1. ábra](#) és a [2. ábra](#) látható.

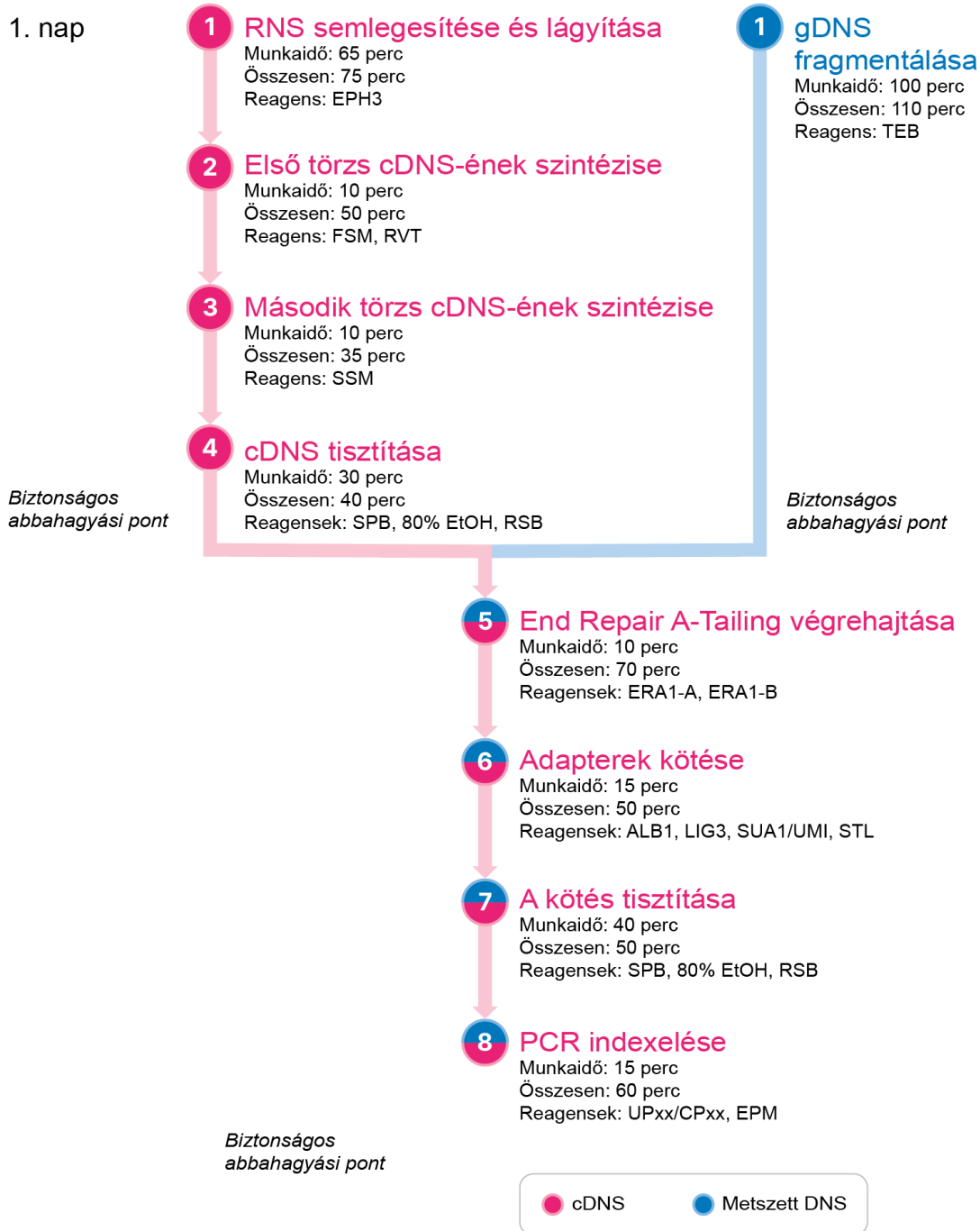
Könyvtárelőkészítési munkafolyamat

[1. ábra](#) a könyvtár TSO Comprehensive (EU) előkészítési munkafolyamatát mutatja be. Az RNS- és DNS-mintákból származó könyvtárak egyidejűleg külön cellákban is elkészíthetők. A pozitív kontrollok és a sablon nélküli kontrollok feldolgozása a mintákkal azonos módon történik. A lépések között jelezve vannak a biztonságos megszakítási pontok.

A protokoll megkezdése előtt írja be a futtatási és mintaadatokat a Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul szoftverbe. Lásd: *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661)*.

1. ábra TSO Comprehensive (EU) Munkafolyamat (1. rész)

1. nap



* A munka- és a teljes idő hozzávetőleges.

Dúsítási munkafolyamat

A 2. ábra a TSO Comprehensive (EU) dúsítási munkafolyamatát mutatja be. A lépések között jelezve vannak a biztonságos megszakítási pontok.

2. ábra TSO Comprehensive (EU) Munkafolyamat (2. rész)



Hőciklus-szabályozó programozása

A vizsgálat megkezdése előtt mentse a következő programokat az amplifikáció előtti és utáni hőciklus-szabályozókra.

10. táblázat Amplifikálás előtti hőciklus-szabályozó programok

Eljárási lépés	Program neve	Fedél hőmérséklete	Reakció térfogata	Hőciklus-szabályozó paraméterei
RNS semlegesítése és lágyítása	LQ-RNS	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> 65 °C 5 percig 4 °C 1 percig Tárolás 4 °C-on
Első törzs cDNS-ének szintézise	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> 25 °C 10 percig 42 °C 15 percig 70 °C 15 percig 4 °C 1 percig Tárolás 4 °C-on
Második törzs cDNS-ének szintézise	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> 16 °C 25 percig 4 °C 1 percig Tárolás 4 °C-on

MEGJEGYZÉS Ha a 2ndSS fedelének hőmérséklete nem állítható 30 °C-ra, kapcsolja ki az előmelegített fedél fűtési opciót.

11. táblázat Amplifikálás utáni hőciklus-szabályozó programok

Eljárási lépés	Program neve	Fedél hőmérséklete	Reakció térfogata	Hőciklus-szabályozó paraméterei
PCR indexelése	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> 98 °C 30 másodpercig 15 ciklus a következők szerint: <ul style="list-style-type: none"> 98 °C 10 másodpercig 60 °C 30 másodpercig 72 °C 30 másodpercig 72 °C 5 percig Tárolás 10 °C-on
Első hibridizáció végrehajtása	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> 95 °C 10 percig 85 °C 2 perc 30 másodpercig 75 °C 2 perc 30 másodpercig 65 °C 2 perc 30 másodpercig 57 °C-on kell tárolni 8–24 órán át

Eljárási lépés	Program neve	Fedél hőmérséklete	Reakció térfogata	Hőciklus-szabályozó paraméterei
Második hibridizáció végrehajtása	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C 10 percig • 85 °C 2 perc 30 másodpercig • 75 °C 2 perc 30 másodpercig • 65 °C 2 perc 30 másodpercig • 57 °C-on, kell tárolni 1,5–4 órán át
Dúsított könyvtár amplifikálása	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C 30 másodpercig • 18 ciklus a következők szerint: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C 10 másodpercig • 60 °C 30 másodpercig • 72 °C 30 másodpercig • 72 °C 5 percig • Tárolás 10 °C-on

Felkészülés a protokollra

Ez az előkészítés szükséges a protokoll következő biztonságos leállítási ponthoz vezető lépéseinek elvégzéséhez.



FIGYELEM!

A munkafolyamat minden eljárásához RNáz-/DNáz-mentes környezet szükséges.

1. Alaposan fertőtlenítse a munkaterületeket RNáz-/DNáz-gátló tisztítószerrel.
2. Győződjön meg arról, hogy az amplifikáció előtti hőciklus-szabályozó programok be vannak állítva. Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
3. Kövesse a gyártó utasításait az ultrasonikátor beállításához.
4. Ha csak DNS-mintákat dolgoz fel, folytassa közvetlenül a [gDNS fragmentálása a\(z\) 48. oldalon](#).
5. Vegye ki az RNS-kontollokat a tárolóból.
6. Vegye ki a reagenscsöveket a dobozból, és kövesse a kiolvasztási utasításokat.

12. táblázat TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (cikkszám: 20031127)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
EPH3	-25 °C és -15 °C között	Olvassza ki szobahőmérsékletre.	RNS semlegesítése és lágyítása
FSM	-25 °C és -15 °C között	Olvassza ki szobahőmérsékletre.	Első törzs cDNS-ének szintézise
RVT	-25 °C és -15 °C között	Tárolja hűtve.	Első törzs cDNS-ének szintézise

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
SSM	-25 °C és -15 °C között	Olvassza ki szobahőmérsékletre.	Második törzs cDNS-ének szintézise

13. táblázat TruSight Oncology Comp Library Prep (hűtő) (cikkszám: 20031119)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
SPB (világoszöld címke)	2 °C és 8 °C között	Melegítse szobahőmérsékletre 30 perc alatt.	cDNS tisztítása
RSB	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	cDNS tisztítása

RNS semlegesítése és lágyítása

Ez a folyamat semlegesíti a tisztított RNS-t, és random hexamerekkel feltölti a cDNS-szintézis előkészítéséhez.

Előkészítés

- Készítse el a következő reagenseket.
 - EPH3—Tegyé félre.
 - FSM—Vortex keverővel keverje. Rövid ideig centrifugálja, majd pipettázza az összekeveréshez. A reagens fehér, termékkel kapcsolatos részecskéket tartalmazhat. Nincs szükség felhasználói műveletre. Nincs hatással a termék teljesítményére.
 - RVT—Rövid ideig centrifugálja, majd pipettázza az összekeveréshez. Tárolja hűtve.

MEGJEGYZÉS Az RVT viszkozus oldat. Pipetázás közben minimalizálja a buborékképződést.

- Kombinálja mikrocentrifuga-csőben a következő térfogatokat az FSM + RVT törzselegy elkészítéséhez.

14. táblázat FSM + RVT törzselegy*

Törzselegy-komponens	4 könyvtár (µl)	8 könyvtár (µl)	16 könyvtár (µl)	24 könyvtár (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Ez a táblázat tartalmazza a térfogattúllépést. A számításokat lásd a [Reagensok kezelése a\(z\) 32. oldalon](#).

- Pipettázza 10-szer a keveréshez.
- Tárolja az FSM + RVT törzselegyet hűtve az [Első törzs cDNS-ének szintézise a\(z\) 44. oldalon](#).

Eljárás

1. Az extrahált RNS-mintákat és RNS-kontrollokat tartsa hűtve kiolvasztás közben.
Az RNS-kontrollokat mintaként dolgozza fel a protokoll hátralévő részében.
2. Az RNS-t tárolja hűtve, amikor nincs használatban. A minták mennyiségi meghatározásához lásd [A mintákkal kapcsolatos követelmények a\(z\) 25. oldalon](#).
3. Pipetázzon minden RNS-mintát 10-szer az összekeveréshez.
4. Használjon RNase/DNase-free watert minden RNS-minta 40 ng-jének elkészítéséhez, 8,5 µl (4,7 ng/µl) végső térfogatban.
Az RNS-kontrollokhöz használja a kémcső címkéjén megadott koncentrációt.
5. Címkézzon fel egy új, 96 cellás CF PCR-lemezt (cDNS-fragmentumok).
6. Adjon 8,5 µl RNS-mintát a CF PCR-lemez egyedi cellájába.
7. Győződjön meg arról, hogy a mintalap elrendezése és az egyes minták indexei megfelelnek a TSO Comprehensive (EU) elemzési modulnak a futtatás beállítása során.
8. Vortex keverővel keverje össze az EPH3-at, majd rövid ideig centrifugálja.
9. Adjon 8,5 µl EPH3-at minden cellába.
10. Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést az CF PCR lemezre.



FIGYELEM!

A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.

11. Rázassa 1200 fordulat/perc sebességgel, 1 percig.
12. Centrifugálja 280g-vel 1 percig.
13. Helyezze egy hőciklus-szabályozóra, és futtassa az LQ-RNS programot.
Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
14. Amikor a minták elérik a 4 °C-ot, tartsa 1 percig. Azonnal folytassa a következő lépéssel.

Első törzs cDNS-ének szintézise

Ez a folyamat fordított transzkripcióval átviszi a random hexamerekkel feltöltött RNS-fragmentumokat az első szál cDNS-ébe, fordított transzkriptáz segítségével.

Eljárás

1. Vegye ki a CF PCR-lemezt a hőciklus-szabályozóból.
2. Pipetázza 10-szer az FSM + RVT törzselegy összekeveréséhez. Győződjön meg arról, hogy az FSM + RVT keverék teljesen homogén.
3. Adjon 8 µl FSM + RVT törzselegyet minden mintacellába.
4. Pipetázza 10-szer a keveréshez.
5. Dobja ki a maradék FSM + RVT törzselegyet.

- Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést az CF PCR lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
- Rázassa 1200 fordulat/perc sebességgel, 1 percig.
- Centrifugálja 280g-vel 1 percig.
- Helyezze egy hőciklus-szabályozóra, és futtassa az 1stSS programot.
Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
- Amikor a minták elérik a 4 °C-ot, azonnal folytassa a következő lépéssel.
Az első szálminták 4 °C-on legfeljebb 5 percig tárolhatók.

Második törzs cDNS-ének szintézise

Ez a folyamat eltávolítja az RNS-mintát, és szintetizálja a két szálú cDNS-t.

Előkészítés

- SSM előkészítése:
 - Keverje össze 10-szeri átfordítással.
 - Röviden centrifugálja. A reagens fehér, termékkel kapcsolatos részecskéket tartalmazhat. Nincs szükség műveletre. Nincs hatással a termék teljesítményére.

Eljárás

- Vegye ki a CF PCR-lemezt a hőciklus-szabályozóból.
- Adjon 25 µl SSM-et minden cellába.
- Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést az CF PCR lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
- Rázassa 1200 fordulat/perc sebességgel, 1 percig.
- Centrifugálja 280g-vel 1 percig.
- Helyezze egy hőciklus-szabályozóra, és futtassa a 2ndSS programot.
Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
- Amikor a minták elérik a 4 °C-ot, tartsa nyomva 1 percig, majd azonnal folytassa a következő lépéssel.

cDNS tisztítása

Ez a folyamat az SPB-t használja a cDNS tisztításához a nem kívánt reakciókomponensektől. A gyöngyök mosása kétszer, friss 80%-os EtOH segítségével történik. A cDNS-t RSB-vel eluált.

Előkészítés

- Készítse el a következő reagenseket.

- SPB—Ügyeljen arra, hogy a gyöngyök 30 percig szobahőmérsékleten legyenek.
 - RSB—Tegye félre az eljárásban való használatához.
2. Készítsen friss 80%-os EtOH-t 15 ml-es vagy 50 ml-es kúpos kémcsőben, az alábbiak szerint.

15. táblázat Készítsen friss 80%-os EtOH-t

Reagens	4 könyvtár	8 könyvtár	16 könyvtár	24 könyvtár
100% EtOH, tiszta	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Vortex keverővel keverje össze a friss 80%-os EtOH-t.
4. Címkézzzen fel egy új, 96 cellás MIDI-lemezt BIND1-gyel (cDNS Binding).
5. Fedje le, és tegye félre.
6. Helyezze el a mágnesset.

Eljárás

Rögzítés

1. Vegye ki a CF PCR-lemezt a hőciklus-szabályozóból.
2. Vortex keverővel keverje az SPB-t a gyöngyök újraszuszpendálásához 1 percig.
3. Azonnal adjon 90 µl SPB-t a BIND1 MIDI-lemez minden mintacellájába.
Ha az SPB adagolásához csatornát használ, akkor 1.15-os többlettényezőt kell alkalmazni, amikor mintánként elegendő anyagot oszt szét. Az SPB minden mintacellába való hozzáadása után dobja ki a maradék anyagot.
4. Vigye át a teljes térfogatot (50 µl) minden mintából a CF PCR-lemezről a BIND1 MIDI-lemez megfelelő cellájába.
5. Dobja ki az üres CF PCR lemezt.
6. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a BIND1 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
7. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
8. Inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.
9. Helyezze a BIND1 MIDI-lemezt 5 percre egy mágneses állványra.
10. Tartsa a lemezt a mágneses állványon. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót mindegyik mintacellából a gyöngypellet felzavarása nélkül.

Mosás

1. Végezze el a gyöngyök mosását a következő módon:
 - a. Tartsa a BIND1 MIDI-lemezt a mágneses állványon, és adjon 200 µl friss 80%-os EtOH-t minden egyes cellába.

- b. Várjon fél percet.
 - c. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót mindegyik cellából a gyöngypellet felzavarása nélkül.
2. Mossa meg a gyöngyöket **még egyszer**.
 3. Használjon finom hegyű pipettát a maradék EtOH eltávolítására minden egyes cellából.
 4. Dobja ki a fel nem használt 80%-os EtOH-t.

Hígítás

1. Távolítsa el a BIND1 MIDI-lemezt a mágneses állványról.
2. Fordítsa meg vagy vortexelje az RSB keveréséhez.
3. Adjon 22 µl RSB-t minden cellába.
4. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a BIND1 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
5. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
6. Inkubálja szobahőmérsékleten 2 percig.
7. Helyezze 2 percre egy mágneses állványra.
8. Címkézzzen fel egy új, 96 cellás MIDI-lemezt PCF-fel (tisztított cDNS-fragmentumok).
Ha megáll a [BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT a\(z\) 47. oldalon](#), használjon PCR-lemezt.
9. Vigyen át 20 µl eluátumot a BIND1 MIDI-lemez minden egyes mintacellájából a PCF PCR-lemez megfelelő cellájába.
10. Ártalmatlanítsa az üres BIND1 MIDI-lemezt.
11. Adjon 30 µl RSB-t a PCF lemezen minden mintát tartalmazó cellába.
12. Pipettázza 10-szer az összekeveréshez.
13. Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést a PCF lemezre, és tartsa hűtve.
14. Helyezze vissza az EPH3, FSM, RVT és SSM adatokat a tárolóba.
15. Ha csak RNS-ből (cDNS) származó mintákat dolgoz fel, és nem áll meg a biztonságos leállítási ponton, folytassa az [End Repair A-Tailing végrehajtása a\(z\) 51. oldalon](#).

BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha megáll, centrifugálja a PCF PCR lemezt 280g erővel 1 percig, és tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 7 napig.

Felkészülés a protokollra

Ez az előkészítés szükséges a protokoll következő biztonságos leállítási ponthoz vezető lépéseinek elvégzéséhez.

1. Vegye ki a DNS-kontrollokat a tárolóból.
2. Vegye ki a reagenscsövet a dobozból, és kövesse a kiolvasztási utasításokat.

16. táblázat TruSight Oncology Comp Library Prep (hűtő) (cikkszám: 20031119)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
TEB	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	gDNS fragmentálása

gDNS fragmentálása

Ez a művelet fragmentálja a gDNS-t, és dsDNS-fragmentumokat hoz létre 3' vagy 5' túlnyúlással.

Előkészítés

- Kövesse a [Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a\(z\) 26. oldalon](#) található vonatkozó ajánlásait a minták kvantifikálásához.
- TEB előkészítése—Fordítsa át vagy vortexelje a keveréshez.

Eljárás

A lemez előkészítése

A lemez előkészítéséhez válassza ki a következő lehetőségek egyikét.

- A gDNS-mintákat a cDNS-mintákkal egyidejűleg dolgozza fel a PCF MIDI-lemezen.
 - Címkézzé fel a PCF MIDI-lemez LP-vel (könyvtárelőkészítés).
 - Tartsa hűtve, és tegye félre a [DNS-fragmentumok átvitele a\(z\) 49. oldalon](#) való használatra .
- A gDNS-mintákat a cDNS-mintákkal egyidejűleg dolgozza fel, míg a PCF PCR-lemez fagyasztott.
 - Olvassa ki a PCF PCR lemezt szobahőmérsékletűre.
 - Centrifugálja 280g-vel 1 percig.
 - Pipettázza 10-szer a keveréshez.
 - Címkézzén fel egy új 96 cellás MIDI-lemezt LP-vel (könyvtárelőkészítés).
 - Vigye át a teljes 50 µl mintát a PCF PCR-lemezeződől az LP MIDI-lemez megfelelő cellájába.
 - Dobja ki a PCF PCR-lemezt.
 - Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést, és tárolja hűtve a [DNS-fragmentumok átvitele a\(z\) 49. oldalon](#) való használatra.
- Csak gDNS-minták feldolgozása.
 - Címkézzén fel egy új 96 cellás MIDI-lemezt LP-vel (könyvtárelőkészítés).
Ha megáll a [BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT a\(z\) 50. oldalon](#), használjon PCR lemezt.
 - Fedje be, és tegye félre a [DNS-fragmentumok átvitele a\(z\) 49. oldalon](#) való használatra .

gDNS hígítása

1. Olvassa ki a gDNS-mintákat és a DNS kontrollokat szobahőmérsékleten.
2. Pipetázzon minden gDNS-mintát 10-szer a keveréshez.
3. Röviden centrifugálja a kémcsövet a cseppek összegyűjtéséhez.
4. Fordítsa át vagy vortexelje a TEB keveréséhez.
5. A TEB segítségével készítsen elő minden egyes gDNS-mintát 52 µl-es végleges térfogatban. A következő táblázat tartalmazza a bemeneti mennyiségeket és a minimális koncentrációkat a mintatípus alapján.
 - A vizsgálat minimális extrakciós koncentrációt igényel, hogy legalább 40 µl TEB-t biztosítson az 52 µl térfogattól.
 - A DNS-kontrollokhoz használja a kémcső címkéjén megadott koncentrációt.
 - A mintavesztés megelőzése érdekében ne pipetázzon 2 µl-nél kevesebb mintát ebbe a hígításba.

Mintatípus	Beviteli összeg (ng)	Minimális koncentráció (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontroll	40	Lásd a kémcső címkéjét

Fragmentum

1. Adjon 52 µl gDNS-mintát az ultrasonikátor-cső külön cellájába.



FIGYELEM!

Lassan töltsse be a gDNS-t a csőbe, ügyelve arra, hogy ne legyenek légrések a cső alján. További információkért lásd a [Vizsgálat a\(z\) 28. oldalon](#) és a gyártó utasításait.

2. Rögzítse a csík tájolását.
3. Fragmentálja a gDNS-t fragmentumokra az ultrasonikátor segítségével.

DNS-fragmentumok átvitele

1. Győződjön meg arról, hogy a mintalemezek elrendezése és indexei minden mintához megegyeznek a TSO Comprehensive (EU) elemzési modul elemzéshez kiválasztott futtatásával.
2. A minta visszanyeréséhez kövesse az ultrasonikátor gyártójának utasításait. Egyes ultrasonikátorcsőtípusoknál centrifugálás szükséges a minta kémcsőben történő konzolidálásához.
3. Minden egyes fragmentált gDNS-mintához használjon finom hegyű pipettát, hogy átvigyen három 16,7 µl-t az LP MIDI-lemez egyik üres cellájába.
4. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az LP MIDI-lemezre.

BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha megáll, helyezze fel az öntapadós lemeztömítést az LP PCR-lemezre, és centrifugálja 280 g erővel 1 percig. Tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 7 napig.

Felkészülés a protokollra

Ez az előkészítés szükséges a protokoll következő biztonságos leállítási ponthoz vezető lépéseinek elvégzéséhez.

Győződjön meg arról, hogy az amplifikáció utáni hőciklus-szabályozó programok be vannak állítva. Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).

1. Készítsen elő egy jégtartó vödröt vagy azzal egyenértékű eszközt.
2. Vegye ki a reagenscsöveket a dobozból, és kövesse a kiolvasztási utasításokat.

17. táblázat TruSight Oncology Comp Library Prep (fagyasztó) doboz (cikkszám: 20031118)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
ERA1-A	-25 °C és -15 °C között	Tárolja hűtve.	End Repair A-Tailing végrehajtása
ERA1-B	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	End Repair A-Tailing végrehajtása
ALB1	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Adapterek kötése
LIG3	-25 °C és -15 °C között	Tárolja hűtve.	Adapterek kötése
SUA1 (kék kupak)	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Adapterek kötése
UMI (fehér kupak)	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Adapterek kötése
STL	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Adapterek kötése
EPM	-25 °C és -15 °C között	Tárolja hűtve.	PCR indexelése

18. táblázat TruSight Oncology Comp Library Prep (hűtő) doboz (cikkszám: 20031119)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
SPB (világoszöld címke)	2 °C és 8 °C között	Melegítse szobahőmérsékletre 30 perc alatt.	A kötés tisztítása
RSB	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	A kötés tisztítása

19. táblázat TruSight Oncology Comp UP Index Primers doboz (cikkszám: 20031120)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
UPxx	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki a megfelelő indexprimercsöveket szobahőmérsékletre.	PCR indexelése

20. táblázat TruSight Oncology Comp CP Index Primers doboz (cikkszám: 20031126)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
CPxx	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki a megfelelő indexprimercsöveket szobahőmérsékletre.	PCR indexelése

End Repair A-Tailing végrehajtása

Ez a folyamat javítja a fragmentációból származó túlnyúlásokat a túlnyúló A-véggel rendelkező végekké egy End Repair A-Tailing törzselegy (ERA1) segítségével.

A keverék 3' - 5' exonukleáz aktivitása eltávolítja a 3' túlnyúlást, és az 5' - 3' polimeráz aktivitás kitölti az 5' túlnyúlást. A reakció során a 3' vég A-végű, hogy ne kötődjenek egymáshoz az adapteres ligációs reakció során.

Előkészítés

- Melegítsen elő 2 mikrominta-inkubátort MIDI hőblokk-betétekkel az alábbiak szerint.
 - Melegítsen elő egy mikrominta-inkubátort 30 °C-ra.
 - Melegítsen elő egy mikrominta-inkubátort 72 °C-ra.
- Készítse el a következő reagenseket.
 - ERA1-A—Rövid ideig centrifugálja, majd pipettázza a keveréshez. Tárolja hűtve.
 - ERA1-B—Vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja. Ellenőrizze, hogy nincsenek-e kicsapódások. Ha van, melegítse fel a kémcsövet 37 °C-ra, majd pipettázza a összekeveréshez, amíg a csapadék feloldódik.
- Készítse elő az ERA1 törzselegyet mikrocentrifuga-csőben.

21. táblázat ERA1 törzselegy*

Törzselegy-komponens	4 könyvtár	8 könyvtár	16 könyvtár	24 könyvtár	48 könyvtár
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

* Ez a táblázat tartalmazza a térfogattúllépést. A számításokat lásd a [Reagensek kezelése a\(z\) 32. oldalon](#).

4. Pipettázza lassan 10-szer a homogenitás megőrzése érdekében, majd centrifugálja röviden. Tárolja hűtve az ERA1 törzselegyet.
5. A lemez előkészítéséhez válassza ki a következő lehetőségek egyikét.
 - Ha a minták MIDI-lemezen vannak, az alábbiak szerint készítse elő őket.
 - a. Címkézze fel újra a MIDI LP2 lemezt (2. könyvtár előkészítése).
 - b. Ha egyes minták külön MIDI lemezeken vannak, helyezze át az összes mintát ugyanannak a MIDI-lemeznek a celláiba a lemez elrendezésének megfelelően.
 - Ha a lemez fagyasztott, készítse elő az alábbiak szerint.
 - a. Olvassza ki a PCF PCR lemezt vagy az LP PCR-lemezt szobahőmérsékletűre.
 - b. Centrifugálja a lemezt 280g-vel 1 percig.
 - c. Pipettázza 10-szer a keveréshez.
 - d. Címkézzen fel egy új 96 cellás MIDI-lemezt LP2-vel (2. könyvtárelőkészítés).
 - e. Vigye át a teljes 50 µl mintát a PCF PCR-lemezről vagy az LP PCR lemezről az LP2 MIDI-lemez megfelelő cellájába.
 - f. Dobja ki a PCF PCR vagy LP PCR-lemezt.

Eljárás

1. Adjon 10 µl ERA1 törzselegyet az LP2 MIDI-lemez minden cellájába.
2. Dobja ki a maradék ERA1 törzselegyet.
3. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az LP2 MIDI-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
4. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
5. Inkubálja az előmelegített mikrominta-inkubátorban 30 °C-on 30 percig.
6. Azonnal vigye át egy második, előmelegített mikrominta-inkubátorba.
7. Inkubálja 72 °C-on 20 percig.
8. Tárolja hűtve az LP2 MIDI-lemezt 5 percig.

Adapterek kötése

Ez a folyamat adaptereket köt a cDNS- és/vagy gDNS-fragmentumok végeihez.

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat SUA1 és UMI adaptereket tartalmaz.

- Használjon SUA1 adaptereket RNS mintáknál.
- Használjon UMI adaptereket DNS-mintákkal.

Előkészítés

1. Készítse el a következő reagenseket.

- ALB1—Vortex keverővel keverje össze legalább 10 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja.
- LIG3—Rövid ideig centrifugálja, majd pipetázza a keveréshez. Tárolja hűtve.
- SUA1—Vortex keverővel keverje össze legalább 10 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja.
- UMI—Vortex keverővel keverje össze legalább 10 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja.
- STL—Tegye félre az eljárásban való használatához.

Eljárás

1. Vegye le az LP2 MIDI-lemezt a jégről vagy hasonló hideg forrásról.
2. Adjon 60 µl ALB1-et az LP2 MIDI-lemez minden cellájába. Az ALB1 viszkozus oldat. A buborékképződés minimalizálása érdekében lassan pipetázzon.
3. Adjon 5 µl LIG3-at minden cellába.
4. Az adaptereket az alábbiak szerint adja hozzá.
Ne kombináljon különböző típusú adaptereket.
 - [RNS-mintacellák]—Adjon hozzá 10 µl SUA1-t (kék kupak) minden RNS-ből származó mintához.
 - [DNS-mintacellák]—Adjon hozzá 10 µl UMI-t (fehér kupak) minden DNS-ből származó mintához.
5. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az LP2 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
6. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
7. Inkubálja szobahőmérsékleten 30 percig.
8. Vortex keverővel keverje össze az STL-t, majd rövid ideig centrifugálja.
9. Adjon 5 µl STL-t az LP2 MIDI-lemez minden cellájába.
10. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az LP2 MIDI-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
11. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.

A kötés tisztítása

Ez a folyamat az SPB-t használja az adapterrel összekapcsolt cDNS- vagy gDNS-fragmentumok tisztítására, és eltávolítja a nemkívánatos termékeket. A gyöngyök mosása kétszer, friss 80%-os etanollal történik. Az adapterrel összekapcsolt minták RSB-vel eluáltak.

Előkészítés

1. Készítse el a következő reagenseket.
 - SPB—Ügyeljen arra, hogy a gyöngyök 30 percig szobahőmérsékleten legyenek.
 - RSB—Tegye félre az eljárásban való használatához.
2. Készítsen friss 80%-os EtOH-t 15 ml-es vagy 50 ml-es kúpos kémcsőben.

22. táblázat Készítsen friss 80%-os etanololdatot.

Reagens	4 könyvtár	8 könyvtár	16 könyvtár	24 könyvtár	48 könyvtár
100% EtOH, tiszta	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Vortex keverővel keverje össze a friss 80%-os EtOH-t.
- Helyezze el a mágnezt.

Eljárás

Rögzítés

- Vortex keverővel keverje az SPB-t a gyöngyök újraszuszpendálásához 1 percig.
- Azonnal adjon 112 µl SPB-t az LP2 MIDI-lemez minden mintacellájába.
Ha az SPB adagolásához csatornát használ, akkor 1,15-os többlettényezőt kell alkalmazni, amikor mintánként elegendő anyagot oszt szét. Az SPB minden mintacellába való hozzáadása után dobja ki a maradék anyagot.
- Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az LP2 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
- Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
- Inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.
- Helyezze az LP2 MIDI-lemezt 10 percre a mágneses állványra.
- 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót mindegyik cellából a gyöngypellet felzavarása nélkül.

Mosás

- Végezze el a gyöngyök mosását a következő módon:
 - Tartsa az LP2 MIDI-lemezt a mágneses állványon, és adjon 200 µl friss 80%-os EtOH-t minden egyes minta cellába.
 - Várjon fél percet.
 - 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót mindegyik cellából a gyöngypellet felzavarása nélkül.
- Mossa meg a gyöngyöket **még egyszer**.
- Használjon finom hegyű pipettát a maradék EtOH eltávolítására minden egyes cellából.
- Dobja ki a fel nem használt 80%-os EtOH-t.

Hígítás

- Távolítsa el az LP2 MIDI-lemezt a mágneses állványról.

2. Fordítsa meg vagy vortexelje az RSB keveréséhez.
3. Adjon 27,5 µl RSB-t minden cellába.
4. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az LP2 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
5. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
6. Inkubálja szobahőmérsékleten 2 percig.
7. Helyezze az LP2 MIDI-lemezt 2 percre egy mágneses állványra.
8. Címkezzon fel egy új 96 cellás LS PCR-lemezt (könyvtárminták).
9. Minden egyes eluátumból vigyen át 25 µl-t az LP2 MIDI-lemezről az LS PCR-lemez megfelelő cellájába.
10. Ártalmatlanítsa az üres LP2 MIDI-lemezt.

PCR indexelése

Ebben a lépésben a könyvtárfragmentumokat olyan primerekkel amplifikálják, amelyek indexszekvenciákat adnak hozzá a minta multiplexeléséhez. Az így kapott termék tartalmazza a cDNS- és/vagy DNS-fragmentumok teljes könyvtárát, amelyeket a klaszter létrehozásához szükséges adapterek borítanak.

Előkészítés

1. Készítse el a következő reagenseket.
 - EPM – Tárolja hűtve.
 - UPxx—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja. Az UPxx a futtatás beállítása során a Local Run Manager szoftverben a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn kiválasztott indexprimer.
 - CPxx—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja. A CPxx a futtatás beállítása során a Local Run Manager szoftverben a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn kiválasztott indexprimer.
2. Győződjön meg arról, hogy az egyes minták indexei megfelelnek a TSO Comprehensive (EU) elemzési modulnak a futtatás beállítása során. Mindenképpen kövesse a [Könyvtárak száma és indexek kiválasztása a \(z\) 34. oldalon](#) részben megadott utasításokat.



FIGYELEM!

A minták és az indexelő primerek közötti eltérések hibás eredményjelentést okoznak a pozitív mintaazonosítás elvesztése miatt.

Eljárás

1. Adjon 5 µl megfelelő indexprimert (UPxx vagy CPxx) a megfelelő mintaüreghez az LS PCR lemezen a kiválasztott indexeknek megfelelően.

**FIGYELEM!**

Egyszerre csak egy indexprimer csövet nyisson ki és kezeljen. Használat után azonnal tegyen új kupakot mindegyik indexcsőre. Ne kombinálja az indexprimereket.

2. Vortex keverővel keverje az EPM-et 5 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja.
3. Adjon 20 µl EPM-et minden üregbe.
4. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az LS PCR-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
5. Rázassa 1200 fordulat/perc sebességgel, 1 percig.
6. Helyezze vissza az amplifikáció előtti reagenseket a tárolóba.

**FIGYELEM!**

Az amplifikációs termék átvitelének megelőzése érdekében az amplifikáció utáni területen hajtsa végre az összes további lépést.

7. Centrifugálja az LS PCR lemezt 280g-vel 1 percig.
8. Helyezze az előre beprogramozott, amplifikáció utáni hőciklus-szabályozóra, és futtassa az I-PCR programot.
Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
Ha folytatja [Az első hibridizáció beállítása a\(z\) 57. oldalon](#), kövesse a reagensek kiolvasztására vonatkozó utasításokat a Protokoll előkészítése részben leírtak szerint.
9. Az I-PCR program befejezése után centrifugálja az LS PCR lemezt 280g-vel 1 percig.
10. Címkézze újra a lemez ALS-t (Amplified Library Samples, amplifikált könyvtárminták).

BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha megáll, tárolja az ALS PCR-lemezt -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten, legfeljebb 30 napig.

Felkészülés a protokollra

Ez a preparátum szükséges az éjszakai hibridizációhoz vezető protokoll-lépések elvégzéséhez.

1. Győződjön meg arról, hogy az amplifikáció utáni hőciklus-szabályozó programok be vannak állítva. Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
2. Vegye ki a reagenscsöveket a dobozból, és kövesse a kiolvasztási utasításokat.

23. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (hűtő) doboz (cikkszám: 20031123)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
TCB1	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Az első hibridizáció beállítása

24. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (fagyasztó) doboz (cikkszám: 20031121)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
TCA1	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Az első hibridizáció beállítása

25. táblázat TruSight Oncology Comp Content Set doboz (cikkszám: 20031122)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
OPR1 (piros kupak)	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Az első hibridizáció beállítása
OPD2 (fehér kupak)	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Az első hibridizáció beállítása

Az első hibridizáció beállítása

E folyamat során az oligók egy közös készlete hibridizál cDNS-könyvtárákká, és az oligók egy közös készlete a [PCR indexelése a\(z\) 55. oldalon](#) előkészített gDNS-könyvtárákká hibridizál. A megcélzott régiók dúsítása két hibridizációs lépést igényel. Az első hibridizáció során az oligók hibridizálnak cDNS-sé és/vagy gDNS-könyvtárákká az éjszaka folyamán (8 óra és 24 óra között).

Előkészítés

1. Készítse el a következő reagenseket.
 - TCB1—Melegítse a csövet 37 °C-on 5 percig. Vortex keverővel keverje össze 10 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja.
 - TCA1—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
 - OPR1—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
 - OPD2—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.

2. Ha az ALS PCR-lemezt tárolta, olvassa ki szobahőmérsékletre, majd centrifugálja 280g erővel 1 percig. Pipetázással keverje össze.
3. Lásjon el egy új 96 cellás PCR-lemezt a HYB felirattal (1. hibridizáció).

Eljárás

1. Vigyen át 20 µl-t minden cDNS- és/vagy gDNS-könyvtárból az ALS PCR-lemezről a HYB1 PCR-lemez megfelelő cellájába.
2. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az ALS PCR-lemezre, és tegye félre. A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
3. Ellenőrizze, hogy nincsenek-e csapadékok a TCB1-ben. Ha van, melegítse fel újra a csövet, és vortex keverővel keverje addig, amíg a kristályok feloldódnak.
4. Adjon 15 µl TCB1-et a HYB1 PCR lemez minden könyvtárcellájába.
5. Adjon 10 µl TCA1-et a HYB1 PCR lemez minden könyvtárcellájába.
6. Adjon hozzá szondákat.
Ne kombináljon különböző típusú szondákat. Cellánként csak egy szondakészletet adjon hozzá.
 - [RNS-könyvtárcellák]—5 µl OPR1 (piros kupak) hozzáadása minden egyes, RNS-ből származtatott könyvtárhoz.
 - [DNS-könyvtár cellák]—Adjon hozzá 5 µl-t OPD2-t (fehér kupak) minden egyes, DNS-ből származtatott könyvtárhoz.
7. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a HYB1 PCR lemezre. A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
8. Rázza 1200 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
9. Helyezze a hőciklus-szabályozóra, és futtassa a HYB1 programot.
Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
10. Hibridizálja 57 °C-on legalább 8 órán át, de legfeljebb 24 órán át.
11. Tegye vissza a hibridizációs reagenseket a tárolóba.
12. Az ALS PCR-lemezt -25 °C és -15 °C között tárolja legfeljebb 30 napig.

Felkészülés a protokollra

Ez az előkészítés szükséges a protokoll következő biztonságos leállítási ponthoz vezető lépéseinek elvégzéséhez.

A 2. nap elején vegye ki a reagenscsöveket a dobozból, és kövesse a kiolvasztási utasításokat.

26. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (hűtő) doboz (cikkszám: 20031123)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
SMB (sötétkék címke)	2 °C és 8 °C között	Melegítse szobahőmérsékletre 30 perc alatt.	Első célok rögzítése Második célok rögzítése
ET2	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Első célok rögzítése Második célok rögzítése
HP3	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Első célok rögzítése Második célok rögzítése Könyvtárak normalizálása
TCB1	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Második hibridizáció beállítása
RSB	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Második célok rögzítése Amplifikált dúsitott könyvtár tisztítása

27. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (fagyasztó) doboz (cikkszám: 20031121)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
EE2	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Első célok rögzítése Második célok rögzítése Könyvtárak normalizálása
EEW	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Első célok rögzítése
TCA1	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Második hibridizáció beállítása

28. táblázat TruSight Oncology Comp Content Set doboz (cikkszám: 20031122)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
OPR1 (piros kupak)	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Második hibridizáció beállítása
OPD2 (fehér kupak)	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Második hibridizáció beállítása

Első célok rögzítése

Ez a lépés az SMB segítségével rögzíti a célrégiókhoz hibridizált szondákat. A gyöngyöket EEW-vel háromszor mossák. A dúsitott könyvtárak friss EE2 + HP3 elúciós keverékkel vannak kioldva, és ET2-vel semlegesítve.

Előkészítés

- Melegítsen elő egy MIDI hőblokkbetéttel ellátott mikrominta-inkubátort 57 °C-ra.
- Készítse el a következő reagenseket.
 - EEW—Vortex keverővel keverje 1 percig.
 - EE2—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
 - HP3—Vortex keverővel keverje össze a HP3-at, majd rövid ideig centrifugálja.
 - SMB—Ügyeljen arra, hogy a gyöngyök 30 percig szobahőmérsékleten legyenek. Ehhez az eljáráshoz az **SMB**-t, és ne az SPB-t használja.
 - ET2—Tegye félre az eljárásban való használatához.
- Készítsen friss EE2 + HP3 elúciós keveréket mikrocentrifugás csőben.

29. táblázat EE2 + HP3 elúciós keverék az első célok rögzítéséhez*

Elúciós keverékkomponens	4 könyvtár	8 könyvtár	16 könyvtár	24 könyvtár	48 könyvtár
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Ez a táblázat tartalmazza a térfogattúllépést. A számításokat lásd a [Reagensek kezelése a\(z\) 32. oldalon](#).

- Vortex keverővel keverje az EE2 + HP3 elúciós keveréket, majd rövid ideig centrifugálja. Tegye félre a [Hígítás a\(z\) 61. oldalon](#).
- Címkézzon fel egy új 96 cellás MIDI-lemezt CAP1-gyel (1. kép).
- Helyezze el a mágnest.

Eljárás

Rögzítés

- Vegye ki a HYB1 PCR lemezt a hőciklus-szabályozóból.
- Centrifugálja a HYB1 PCR lemezt 280g-vel 1 percig.
- Vortex keverővel keverje az SPMB-t a gyöngyök újraszuszpendálásához 1 percig.
Ha csapadék vagy gyöngypellet van jelen, győződjön meg arról, hogy elérte a szobahőmérsékletet, pipettázza fel és le a pellet kioldásához, majd vortexelje a reszuszpendáláshoz.
- Azonnal adjon 150 µl SMB-t a CAP1 MIDI-lemez minden könyvtárcellájába.
Ha az SMB adagolásához csatornát használ, akkor a szétosztáskor alkalmazzon 1,15-ös többlettényezőt annak érdekében, hogy mintánként elegendő anyag álljon rendelkezésre.
- Az SMB minden egyes mintacellába történt adagolása után dobja ki a maradék anyagot.
- Állítsa a pipettát 50 µl-re, és vigye át a teljes térfogatot a HYB1 PCR lemez mindegyik könyvtárcellájából a CAP1 MIDI-lemez megfelelő cellájába.
- Dobja ki az üres HYB1 PCR lemezt.

8. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a CAP1 MIDI-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
9. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
10. Inkubálja az előmelegített mikrominta-inkubátorban 57 °C-on 25 percig.
11. Helyezze a CAP1 MIDI-lemezt 2 percre egy mágneses állványra.
12. Tartsa a lemezt a mágneses állványon. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót minden egyes cellából, a gyöngypellet felzavarása nélkül.



FIGYELEM!

Azonnal folytassa a következő lépéssel ([Mosás a\(z\) 61. oldal](#)). Ne hagyja, hogy a gyöngypellet hosszabb ideig, folyadék jelenléte nélkül legyen.

Mosás

1. Végezze el a gyöngyök mosását a következő módon:
 - a. Távolítsa el a CAP1 MIDI-lemezt a mágneses állványról.
 - b. Adjon 200 µl EEW-t minden üregbe.
 - c. Használjon 150 µl-re állított pipettát, és pipettázzon legalább 10-szer a keveréshez. Győződjön meg arról, hogy az összes gyöngy újraszuszpendált.
Győződjön meg arról, hogy nincs jelen gyöngypellet, óvatosan szívja fel a cella teljes gyöngyoldatát a hegybe. Ellenőrizze szemrevételezéssel minden egyes cella alját. Ha gyöngypellet van jelen, állítsa a pipettahegyet a pellet felé a mosási lépések során a pellet kimozdításához. Győződjön meg arról, hogy a gyöngypellet teljesen bele legyen merítve az oldatba. Az oldatnak sötétbarnának és homogén állagúnak kell lennie.
 - d. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a CAP1 MIDI-lemezre.
 - e. A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
 - f. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 4 percig.
 - g. Inkubálja mikrominta-inkubátorban 57 °C-on 5 percig.
 - h. Helyezze a CAP1 MIDI-lemezt 2 percre egy mágneses állványra.
 - i. Tartsa a lemezt a mágneses állványon. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót minden egyes cellából, a gyöngypellet felzavarása nélkül.
2. Mossa meg a gyöngyöket **még egyszer**.
3. Mossa meg a gyöngyöket **harmadik** alkalommal.
4. Használjon finom hegyű pipettát a maradék EEW eltávolítására minden egyes cellából.

Hígítás

1. Távolítsa el a CAP1 MIDI-lemezt a mágneses állványról.
2. Vortex keverővel keverje össze a friss EE2 + HP3 elúciós keveréket, majd rövid ideig centrifugálja.

- Óvatosan adjon 17 µl EE2 + HP3 elúciós keveréket a CAP1 MIDI-lemez minden egyes könyvtárcellájába.
- Dobja ki a maradék EE2 + HP3 elúciós keveréket.
- Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a CAP1 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
- Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
- Helyezze 2 percre egy mágneses állványra.
- Címkézzen fel egy új 96 cellás PCR-lemezt ELU1-gyel (1. elúció).
- Vortex keverővel keverje össze az ET2-t, majd rövid ideig centrifugálja.
- Adjon 5 µl ET2-t az új ELU1 PCR lemez megfelelő könyvtárcellájába.
- Óvatosan vigyen át 15 µl eluátumot a CAP1 MIDI-lemez minden egyes könyvtárcellájából az ELU1 PCR-lemez megfelelő cellájába.
- Ártalmatlanítsa az üres CAP1 MIDI-lemezt.
- Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az ELU1 PCR-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
- Rázza 1200 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
- Helyezze vissza az EEW-t a tárolóba.

Második hibridizáció beállítása

Ez a lépés másodszor is összekapcsolja a dúsított cDNS- és/vagy gDNS-könyvtárak célzott régióit a rögzítő szondákkal. A második hibridizáció biztosítja a rögzített régiók magas specifikusságát. A könyvtárak optimális dúsítása érdekében végezze el a második hibridizációs lépést 57 °C-on legalább 1,5 órán, de legfeljebb 4 órán át.

Előkészítés

- Készítse el a következő reagenseket.
 - TCB1—Melegítse a csövet 37 °C-on 5 percig. Vortex keverővel keverje össze 10 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja.
 - TCA1—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
 - OPR1—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
 - OPD2—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.

Eljárás

- Ellenőrizze, hogy nincsenek-e csapadékok a TCB1-ben. Ha van, melegítse fel újra a csövet, és vortex keverővel keverje a kristályok feloldódásáig.
- Adjon 15 µl TCB1-et az ELU1 PCR-lemez minden könyvtárcellájába.
- Adjon 10 µl TCA1-et minden könyvtárcellába.

4. Minden üreghez ugyanazt a szondát adja hozzá, mint amelyet az első hibridizáció során használt. Cellánként csak egy szondakészletet adjon hozzá.
Ne kombináljon különböző típusú szondákat.
 - **[-RNS-könyvtárcellák]**—5 µl OPR1 (piros kupak) hozzáadása minden egyes, RNS-ből származtatott könyvtárhoz.
 - **[DNS-könyvtárcellák]**—5 µl OPD2 (fehér kupak) hozzáadása minden egyes, DNS-ből származtatott könyvtárhoz.
5. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az ELU1 PCR-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
6. Rázza 1200 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
7. Helyezze hőciklus-szabályozóra, és futtassa a HYB2 programot.
Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
8. Hibridizálja 57 °C-on legalább 1,5 óráig, de legfeljebb 4 óráig.
9. Tegye vissza a hibridizációs reagenseket a tárolóba.

Második célok rögzítése

Ez a lépés az SMB segítségével rögzíti a célrégiókhoz hibridizált szondákat. A gyöngyök mosása RSB-vel történik. A dúsított könyvtárak friss EE2 + HP3 elúciós keverékkel vannak kioldva, és ET2-vel semlegesítve.

Előkészítés

1. Melegítsen elő egy MIDI hőblokkbetéttel ellátott mikrominta-inkubátort 57 °C-ra.
2. Készítse el a következő reagenseket.
 - EE2—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
 - HP3—Vortex keverővel keverje össze a HP3-at, majd rövid ideig centrifugálja.
 - SMB—Ügyeljen arra, hogy a gyöngyök 30 percig szobahőmérsékleten legyenek. Ehhez az eljárásához az **SMB**-t, és ne az SPB-t használja.
 - RSB—Tegye félre az eljárásban való használathoz.
 - ET2—Tegye félre az eljárásban való használathoz.
3. Készítsen friss EE2 + HP3 elúciós keveréket mikrocentrifugás csőben.

30. táblázat EE2 + HP3 elúciós keverék a második célok rögzítéséhez*

Elúciós keverékkomponens	4 könyvtár	8 könyvtár	16 könyvtár	24 könyvtár	48 könyvtár
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Ez a táblázat tartalmazza a térfogattűlépést. A számításokat lásd a [Reagensek kezelése a\(z\) 32. oldalon](#).

4. Vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja. Tegye félre a [Hígítás a\(z\) 65. oldal](#)on.
5. Címkézzzen fel egy új 96 cellás MIDI-lemezt CAP2-vel (2. kép).
6. Helyezze el a mágnesset.

Eljárás

Rögzítés

1. Vegye ki az ELU1 PCR-lemezt a hőciklus-szabályozóból.
2. Centrifugálja az ELU1 PCR-lemezt 280g-vel 1 percig.
3. Vortex keverővel keverje az SPMB-t a gyöngyök újraszuszpendálásához 1 percig.
Ha csapadék vagy gyöngypellet van jelen, győződjön meg arról, hogy elérte a szobahőmérsékletet, pipettázza fel és le a pellet kioldásához, majd vortexelje a reszuszpendáláshoz.
4. Azonnal adjon 150 µl SMB-t a CAP2 MIDI-lemez minden könyvtárcellájába.
Ha az SMB adagolásához csatornát használ, akkor a szétosztáskor alkalmazzon 1,15-ös többlettényezőt annak érdekében, hogy mintánként elegendő anyag álljon rendelkezésre.
5. Az SMB minden egyes mintacellába történt adagolása után dobja ki a maradék anyagot.
6. Állítsa a pipettát 50 µl-re, és vigye át a teljes térfogatot az ELU1 PCR-lemez mindegyik cellájából a CAP2 MIDI-lemez megfelelő cellájába.
7. Dobja ki az üres ELU1 PCR-lemezt.
8. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a CAP2 MIDI-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
9. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
10. Inkubálja mikrominta-inkubátorban 57 °C-on 25 percig.
Ha folytatja a [Dúsított könyvtár amplifikálása a\(z\) 67. oldal](#)on, kövesse a [Felkészülés a protokollra](#) részben található, reagensek kiolvasztására vonatkozó utasításokat.
11. Helyezze 2 percre egy mágneses állványra.
12. Tartsa a CAP2 MIDI-lemezt a mágneses állványon. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót minden egyes cellából, a gyöngypellet felzavarása nélkül.



FIGYELEM!

Azonnal folytassa a következő lépéssel ([Mosás a\(z\) 64. oldal](#)on). Ne hagyja, hogy a gyöngypellet hosszabb ideig, folyadék jelenléte nélkül legyen.

Mosás

1. Távolítsa el a CAP2 MIDI-lemezt a mágneses állványról.
2. Fordítsa meg vagy vortexelje az RSB keveréséhez.
3. Adjon 200 µl RSB-t minden cellába.
4. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a CAP2 MIDI-lemezre.

Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.

5. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 4 percig.
6. Helyezze a lemezt 2 percre a mágneses állványra.
7. Tartsa a lemezt a mágneses állványon. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót minden egyes cellából, a gyöngypellet felzavarása nélkül.
8. Használjon finom hegyű pipettát a maradék RSB eltávolítására minden egyes cellából.

Hígítás

1. Távolítsa el a CAP2 MIDI-lemezt a mágneses állványról.
2. Vortex keverővel keverje össze a friss EE2 + HP3 elúciós keveréket, majd rövid ideig centrifugálja.
3. Adjon 22 µl EE2 + HP3 elúciós keveréket a CAP2 MIDI-lemez minden egyes könyvtárcellájába.
4. Dobja ki a maradék EE2 + HP3 elúciós keveréket.
5. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a CAP2 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
6. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
7. Helyezze 2 percre egy mágneses állványra.
8. Címkézzzen fel egy új 96 cellás PCR-lemezt ELU2-vel (2. elúció).
9. Vortex keverővel keverje össze az ET2-t, majd rövid ideig centrifugálja.
10. Adjon 5 µl ET2-t az új ELU2 PCR lemez megfelelő könyvtárcellájába.
11. Óvatosan vigyen át 20 µl eluátumot a CAP2 MIDI-lemez minden egyes könyvtárcellájából az ELU2 PCR-lemez megfelelő cellájába.
12. Ártalmatlanítsa az üres CAP2 MIDI-lemezt.
13. Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést az ELU2 PCR-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
14. Rázza 1200 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
15. Helyezze vissza az SMB-t, az EE2-t, a HP3-at, RSB-t és ET2-t a tárolóba.

BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha megáll, centrifugálja az ELU2 PCR-lemezt 280g erővel 1 percig, és tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 7 napig.

Felkészülés a protokollra

Ez az előkészítés szükséges a protokoll következő biztonságos leállítási ponthoz vezető lépéseinek elvégzéséhez.

1. Készítsen elő egy jégtartó vödröt vagy azzal egyenértékű eszközt.
2. Vegye ki a reagenscsöveket a dobozból, és kövesse a kiolvasztási utasításokat.

31. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (fagyasztó) doboz (cikkszám: 20031121)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
PPC3	-25 °C és -15 °C között	Olvassza ki szobahőmérsékletre.	Dúsított könyvtár amplifikálása
EPM	-25 °C és -15 °C között	Tárolja hűtve.	Dúsított könyvtár amplifikálása

32. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (hűtő) doboz (cikkszám: 20031123)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
SPB (világoszöld címke)	2 °C és 8 °C között	Melegítse szobahőmérsékletre 30 perc alatt.	Amplifikált dúsított könyvtár tisztítása
RSB	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Amplifikált dúsított könyvtár tisztítása Előkészítés a szekvenáláshoz

Dúsított könyvtár amplifikálása

Ez a lépés primereket használ a dúsított könyvtárak amplifikálásához.

Előkészítés

- Ha az ELU2 lemezt tárolta, olvassa ki szobahőmérsékletűre, majd centrifugálja 280 g erővel 1 perccig.

Eljárás

- Vortex keverővel keverje össze a PPC3-at, majd rövid ideig centrifugálja az összekeveréshez.
- Adjon 5 µl PPC3-at az ELU2 PCR-lemez minden könyvtárcellájába.
- Vortex keverővel keverje az EPM-et 5 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja.
- Adjon 20 µl EPM-et minden könyvtárcellába.
- Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést az ELU2 PCR-lemezre.
A párologás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
- Rázza 1200 fordulat/perc sebességgel, 2 perccig.
- Helyezze egy hőciklus-szabályozóra, és futtassa az EL-PCR programot.
Lásd a [Hőciklus-szabályozó programozása a\(z\) 41. oldalon](#).
Ha folytatja a [Könyvtárak normalizálása a\(z\) 70. oldalon](#), kövesse a [Felkészülés a protokollra](#) részben található kiolvasztási utasításokat.
- Helyezze vissza a PPC3-at és az EPM-et a tárolóba.

Amplifikált dúsított könyvtár tisztítása

Ez a lépés az SPB segítségével tisztítja meg a dúsított könyvtárakat a nemkívánatos reakció összetevőitől. A gyöngyök mosása kétszer, friss 80%-os etanollal történik. A könyvtárakat RSB-vel eluálják.

Előkészítés

- Készítse el a következő reagenseket.
 - SPB—Ügyeljen arra, hogy a gyöngyök 30 percig szobahőmérsékleten legyenek. Ehhez az eljáráshoz **SPB**-t, és ne **SMB**-t használjon.
 - RSB—Tegye félre az eljárásban való használathoz.
- Készítsen friss 80%-os etanolt 15 ml-es vagy 50 ml-es kúpos kémcsőben.

33. táblázat Készítsen friss 80%-os etanololdatot.

Reagens	4 könyvtár	8 könyvtár	16 könyvtár	24 könyvtár	48 könyvtár
100% EtOH, tiszta	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Vortex keverővel keverje össze a friss 80%-os EtOH-t.
4. Címkézzzen fel egy új 96 cellás MIDI-lemezt BIND2-vel (Clean Up Binding).
5. Helyezze el a mágnezt.

Eljárás

Rögzítés

1. Vegye ki az ELU2 PCR-lemezt a hőciklus-szabályozóból.
2. Centrifugálja az ELU2 PCR-lemezt 280g-vel 1 percig.
3. Vortex keverővel keverje az SPB-t a gyöngyök újraszuszpendálásához 1 percig.
4. Azonnal adjon 110 µl SPB-t a BIND2 MIDI-lemez minden könyvtárcellájába.
5. Vigyen át 50 µl-t az ELU2 PCR-lemez mindegyik könyvtárcellájából a BIND2 MIDI-lemez megfelelő cellájába.
6. Dobja ki az üres ELU2 PCR lemezt.
7. Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést a BIND2 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
8. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
9. Inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.
10. Helyezze a BIND2 MIDI-lemezt 5 percre egy mágneses állványra.
11. Tartsa a lemezt a mágneses állványon. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót minden egyes cellából, a gyöngypellet felzavarása nélkül.

Mosás

1. Végezze el a gyöngyök mosását a következő módon:
 - a. Tartsa a BIND2 MIDI-lemezt a mágneses állványon, és helyezzen 200 µl friss 80%-os EtOH-t minden egyes üregbe.
 - b. Várjon fél percet.
 - c. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót minden egyes cellából, a gyöngypellet felzavarása nélkül.
2. Mossa meg a gyöngyöket **még egyszer**.
3. Használjon finom hegyű pipettát a maradék EtOH eltávolítására minden egyes cellából.
4. Dobja ki a fel nem használt 80%-os EtOH-t.

Hígítás

1. Távolítsa el a BIND2 MIDI-lemezt a mágneses állványról.
2. Fordítsa át vagy vortexelje az RSB keveréséhez.
3. Adjon 32 µl RSB-t minden könyvtárcellába.

4. Helyezze fel az öntapadós lemeztömítést a BIND2 MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
5. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
6. Inkubálja szobahőmérsékleten 2 percig.
7. Helyezze 2 percre egy mágneses állványra.
8. Címkezzon fel egy új 96 cellás PCR-lemezt: PL (tisztított könyvtárak).
9. Minden egyes eluátumból vigyen át 30 µl-t a BIND2 MIDI-lemezről a PL PCR-lemez megfelelő cellájába.
10. Ártalmatlanítsa az üres BIND2 MIDI-lemezt.
11. Helyezze fel az ragasztós lemeztömítést a PL PCR lemezre.
12. Tegye vissza az SBP-t és az RSB-t a tárolóba.

BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha megáll, centrifugálja a PL PCR lemezt 280g erővel 1 percig, és tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 30 napig.

Felkészülés a protokollra

Ez az előkészítés szükséges a protokoll következő biztonságos leállítási ponthoz vezető lépéseinek elvégzéséhez.

1. Vegye ki a reagenscsöveket a dobozból, és kövesse a kiolvasztási utasításokat.

34. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (fagyasztó) doboz (cikkszám: 20031121)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
LNA1	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Könyvtárak normalizálása
EE2	-25 °C és -15 °C között	Olvassa ki szobahőmérsékletre.	Könyvtárak normalizálása

35. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (hűtő) doboz (cikkszám: 20031123)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
LNB1	2 °C és 8 °C között	Melegítse szobahőmérsékletre 30 perc alatt.	Könyvtárak normalizálása
HP3	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Könyvtárak normalizálása Előkészítés a szekvenáláshoz
LNW1	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Könyvtárak normalizálása
LNS1	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Könyvtárak normalizálása

2. Ha még aznap folytatja az [Előkészítés a szekvenáláshoz a\(z\) 73. oldalon](#) oldalon, kövesse a [Felkészülés a protokollra](#) című részben található kiolvasztási utasításokat.

Könyvtárak normalizálása

Ez a folyamat LNB1 plusz adalékanyagokat (LNA1) használ az egyes könyvtárak mennyiségének normalizálásához, hogy biztosítsa a könyvtár egységes megjelenítését az összevont könyvtárakban. A gyöngyök mosása kétszer történik LNW1-gyel. A könyvtárak friss EE2 + HP3 elúciós keverékkel eluáltak, és LNS1-gyel kerülnek semlegesítésre.

Előkészítés

- Készítse el a következő reagenseket.
 - LNB1—Ügyeljen arra, hogy a gyöngyök 30 percig szobahőmérsékleten legyenek.
 - LNA1—Vortex keverővel keverje össze.
 - EE2—Vortex keverővel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
 - HP3—Vortex keverővel keverje össze a HP3-at, majd rövid ideig centrifugálja.
 - LNW1—Vortex keverővel keverje össze. Tegye félre eljárásban való használathoz.
 - LNS1—Vortex keverővel keverje össze. Tegye félre az eljárás során történő használathoz.
- Vortex keverővel keverje az LNB-t a gyöngyök újraszuszpendálásához 1 percig. Fordítsa meg az LNB1 csövet, hogy meggyőződjön arról, hogy az összes gyöngy újraszuszpendálódott.
- A 800 µl-re beállított pipettakészlet segítségével pipettázza az LNB1-et 10-szer fel és le az újraszuszpendálás biztosítása érdekében.
- Azonnal készítse elő a friss LNA1 + LNB1 törzselegyet egy kúpos kémcsőben.



FIGYELEM!

Teljesen szuszpendálja újra az LNB1 gyöngypelletet a kémcső alján, hogy megelőzze a klaszter inkonzisztens sűrűségét.

36. táblázat LNA1 + LNB1 törzselegyet*

Törzselegy-komponens	4 könyvtár	8 könyvtár	16 könyvtár	24 könyvtár	48 könyvtár
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Ez a táblázat tartalmazza a térfogattúllépést. A számításokat lásd a [Reagensek kezelése a\(z\) 32. oldalon](#).

- Vortex keverővel keverje össze az LNA1 + LNB1 törzselegyet. Tegye félre a [Rögzítés a\(z\) 71. oldalon](#).

6. Készítsen friss EE2 + HP3 elúciós keveréket mikrocentrifuga-csőben.

37. táblázat EE2 + HP3 elúciós keverék a könyvtárak normalizálásához*

Elúciós keverékkomponens	4 könyvtár	8 könyvtár	16 könyvtár	24 könyvtár	48 könyvtár
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Ez a táblázat tartalmazza a térfogattűlépést. A számításokat lásd a [Reagensok kezelése a\(z\) 32. oldalon](#).

7. Vortex keverővel keverje össze a friss elúciós keveréket, majd rövid ideig centrifugálja. Tegye félre a [Hígítás a\(z\) 72. oldalon](#).
8. Ha a PL PCR-lemezt tárolta, olvassza ki szobahőmérsékleten, majd centrifugálja 280 g erővel 1 percig. Pipetázással keverje össze.
9. Címkezzon fel egy új 96 cellás MIDI-lemezt BBN-ként (gyöngyalapú normalizálás).
10. Helyezze el a mágnesset.

Eljárás

Rögzítés

- Vortex keverővel keverje össze az LNA1 + LNB1 törzselegyet.
- Azonnal adjon 45 µl LNA1 + LNB1 törzselegyet a BBN MIDI-lemez minden könyvtárcellájába.
- Dobja ki a maradék LNA1 + LNB1 törzselegyet.
- Adjon 20 µl-t az PL PCR-lemez mindegyik cellájából a BBN MIDI-lemez megfelelő cellájába.
- Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a BBN MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
- Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 30 percig.
- Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a PL PCR-lemezre, és helyezze vissza a tárolóba.
- Helyezze a BBN MIDI-lemezt 2 percre egy mágneses állványra.
- Tartsa a lemezt a mágneses állványon. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót minden egyes cellából, a gyöngypellet felzavarása nélkül.

Mosás

- Végezze el a gyöngyök mosását a következő módon:
 - Vegye le a BBN MIDI-lemezt a mágneses állványról.
 - Adjon 45 µl LNW1-et minden könyvtárcellába.
 - Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a BBN MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
 - Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 5 percig.

- e. Helyezze a BBN MIDI-lemezt 2 percre egy mágneses állványra.
 - f. Tartsa a lemezt a mágneses állványon. 200 µl-re beállított pipettával távolítsa el és dobja ki az összes felülúszót minden egyes cellából, a gyöngyepellet felzavarása nélkül.
2. Mossa meg a gyöngyöket *még egyszer*.
 3. Használjon finom hegyű pipettát a maradék felülúszó eltávolítására az egyes cellákból.

Hígítás

1. Vegye le a BBN MIDI-lemezt a mágneses állványról.
2. Vortex keverővel keverje össze a friss EE2 + HP3 elúciós keveréket, majd rövid ideig centrifugálja.
3. Adjon 32 µl EE2 + HP3 oldatot a BBN MIDI-lemez minden könyvtárcellájába.
4. Dobja ki a maradék elúciós keveréket.
5. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést a BBN MIDI-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
6. Rázza 1800 fordulat/perc sebességgel, 2 percig.
7. Helyezze 2 percre egy mágneses állványra.
8. Címkézzzen fel egy új 96 cellás PCR-lemezt NL-ként (normálizált könyvtárak).
9. Óvatosan vigyen át 30 µl eluátumot a BBN MIDI-lemez minden egyes könyvtárcellájából az NL PCR-lemez megfelelő cellájába.



FIGYELEM!

Ha a gyöngyöket a pipettahegyekbe szívja fel, adagolja a gyöngyöket vissza a mágneses állványon lévő lemezbe, és várjon, amíg a folyadék tiszta nem lesz (~2 perc), mielőtt az eljárás következő lépésére lépne.

10. Ártalmatlanítsa az üres BBN MIDI-lemezt.
11. Vortex keverővel keverje össze az LNS1-et.
12. Adjon 30 µl LNS1-et az NL PCR lemez minden könyvtárcellába.
13. Pipettázza ötször a keveréshez.
14. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az NL PCR-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
15. Helyezze vissza az LNB1, LNA1, EE2, LNW1 és LNS1 reagenseket a tárolóba.

BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha megáll, centrifugálja a NL PCR-lemezt 280g erővel 1 percig, és tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 32 napig.

Felkészülés a protokollra

Ez az előkészítés szükséges a protokoll szekvenáláshoz vezető lépéseinek elvégzéséhez.

Legalább egy órával a használat előtt kezdje el a szekvenálási fogyóeszközök előkészítését a NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (cikkszám: 20028871) készletből.

1. Vegye ki a könyvtári hígítási puffert (HT1) a -25 °C és -15 °C közötti tárolóból. Olvassza ki szobahőmérsékletre. Kiolvasztás után tartsa hidegen.
2. Kövesse a *NextSeq 550Dx készülék referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)* dokumentumban található előkészítési utasításokat a készletben található egyéb fogyóeszközök tekintetében.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklus)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 ciklus)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 ciklus)
3. Vegye ki a reagenscsöveket a dobozból, és kövesse a kiolvasztási utasításokat.

38. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (fagyasztó) doboz (cikkszám: 20031121)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
PhiX belső kontroll (PX3 vagy PhiX)	-25 °C és -15 °C között	Olvassza ki szobahőmérsékletre. Kiolvasztás után tartsa hidegen.	Előkészítés a szekvenáláshoz

39. táblázat TruSight Oncology Comp Enrichment (hűtő) doboz (cikkszám: 20031123)

Reagens	Tárolás	Kiolvasztási utasítások	Protokoll-lépés
HP3	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Előkészítés a szekvenáláshoz
RSB (rózsaszínű címke)	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre.	Előkészítés a szekvenáláshoz

Előkészítés a szekvenáláshoz

Minden DNS- és RNS-szekvenálási futtatásnak pozitív kontrollt és NTC-t kell tartalmaznia. A DNS és az RNS NTC-i szükség szerint ismételten sorba rendeződnek, így minden futtatás tartalmaz egy NTC-t. Minden DNS- és RNS-futtatás külön pozitív kontrollt tartalmaz.

Előkészítés

1. Tekintse át a [Könyvtárak száma és indexek kiválasztása a\(z\) 34. oldalon](#).
2. Címkézzon fel egy dHP3 (hígított HP3) mikrocentrifuga-csővet.

3. Címkézzzen fel egy dPhiX (hígított PhiX) mikrocentrifuga-csővet.
4. Melegítsen elő egy hőblokkot 96 °C-ra a mikrocentrifuga-csövekhez.
5. Készítsen elő egy jégtartó vödröt vagy azzal egyenértékű eszközt.

A PhiX kontroll hígítása és denaturálása

1. Vortexeléssel keverje össze a HP3-at, majd rövid ideig centrifugálja.
2. Adja a következő térfogatokat egy dHP3 mikrocentrifuga-csőbe.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNáz-/DNáz-mentes víz
3. Vortexeléssel keverje össze a dHP3-at, majd rövid ideig centrifugálja.
4. Fordítsa meg vagy vortexelje az RSB keveréséhez.
5. Vortexeléssel keverje össze a PhiX kontrollt, majd rövid ideig centrifugálja.
6. Adja a következő térfogatokat egy dPhiX mikrocentrifuga-csőbe.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX kontroll
7. Adjon 10 µl dHP3-t a dPhiX-csőhöz.
8. Dobja ki a dHP3-csővet.
9. Vortexeléssel keverje össze a dPhiX-csővet, majd rövid ideig centrifugálja.
10. Inkubálja a dPhiX-et szobahőmérsékleten 5 percig a denaturálás miatt.
11. Vortexelje a HT1-et a keveréshez.
12. Azonnal adjon hozzá 980 µl előhűtött HT1-et a dPhiX-hez.
13. Vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
14. Helyezze a PhiX-et hűtött helyre, amíg fel nem használja a második hígításra való előkészítéshez.
A végső koncentráció 20 pM dPhiX.
15. Helyezze vissza a PhiX, HP3 és RSB egységet a tárolóba.

Könyvtárak összevonása és semlegesítése: TSO Comprehensive (EU)

1. Ha az NL PCR-lemezt tárolta, olvassa ki szobahőmérsékletre, majd centrifugálja a lemezt 280g erővel 1 percig.
2. Egy 30 µl-re beállított többcsatornás pipettával óvatosan keverje össze ötször az NL PCR-lemez könyvtárait.
Használjon új hegyeket minden könyvtárhoz.



FIGYELEM!

Ügyeljen arra, hogy a könyvtárakat jól keverje össze az optimális teljesítmény érdekében.

3. Válassza az alábbi lehetőségek egyikét a könyvtárak összegyűjtéséhez, semlegesítéséhez és hígításához.

- [1. lehetőség] Az RNS-mintákból és a DNS-mintákból párhuzamosan származó szekvenciakönyvtárak. Lásd az [1. opció: DNS és RNS-könyvtárak együtt a\(z\) 75. oldalon](#)
- [2. lehetőség] Csak DNS-mintákból származó szekvenciakönyvtárak. Lásd a [2. opció: Csak DNS-könyvtárak a\(z\) 76. oldalon](#).
- [3. lehetőség] Csak RNS-mintákból származó szekvenciakönyvtárak. Lásd a [3. opció: Csak RNS-könyvtárak a\(z\) 77. oldalon](#).

1. opció: DNS és RNS-könyvtárak együtt

1. Címkézzzen fel egy mikrocentrifuga-csövet PRL-lel (összevont RNS-könyvtárak).
2. Címkézzzen fel egy mikrocentrifuga-csövet PDL-lel (összevont DNS-könyvtárak).
3. Vigyen át 10 µl-t minden normalizált RNS- (cDNS) könyvtárból az NL lemezről a PRL kémcsőbe. Ne egyesítsen két könyvtárat ugyanazzal az indexprimerrel.
4. Vigyen át 10 µl-t minden normalizált DNS-könyvtárból az NL lemezről a PDL kémcsőbe. Ne egyesítsen két könyvtárat ugyanazzal az indexprimerrel.
5. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az NL PCR-lemezre. Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
6. Vortex keverővel keverje össze a PRL és PDL csöveket.
7. Centrifugálja röviden a PRL és PDL kémcsöveket.
8. Inkubálja a PRL és PDL kémcsöveket hőblokkban 96 °C-on 2 percig.
9. A PRL és PDL csöveket tárolja hűtve 5 percig.
10. Vortex keverővel keverje össze a PRL és PDL csöveket, majd rövid ideig centrifugálja.
11. A PRL és PDL kémcsöveket tárolja hűtve.

Az első hígítás előkészítése

1. Címkézzzen fel egy DIL1 mikrocentrifuga-csövet (1. hígítás).
2. Vigyen át 20 µl PDL-t az üres DIL1 csőbe.
3. Adjon 5 µl PRL-t a DIL1 csőhöz.
4. Dobja ki a PDL és PRL csöveket.
5. Adjon 475 µl előhűtött HT1-et a DIL1 csőhöz (1:20 hígítás).
6. Vortex keverővel keverje össze a DIL1 csövet, majd rövid ideig centrifugálja.

Második hígítás előkészítése

1. Címkézzzen fel egy 2,0 ml-es DIL2 mikrocentrifuga-csövet (2. hígítás).
2. Vigyen át 40 µl DIL1-et az üres DIL2 csőbe.
3. Dobja ki a DIL1 csövet.
4. Adjon 1660 µl előhűtött HT1-et a DIL2 csőhöz (1:850 hígítás).
5. Vortex keverővel keverje össze az előkészített 20 pM dPhiX-et, majd rövid ideig centrifugálja.
6. Adjon 2,5 µl előkészített 20 pM dPhiX-et a DIL2 csőhöz.
7. Vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
8. Töltsön be 1300 µl DIL2-t a kiolvasztott NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2-be (300 ciklus).
További információkért lásd: *NextSeq 550Dx készülék referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.
9. Dobja ki a DIL2 csövet.
10. Centrifugálja az NL PCR-lemezt 280g erővel 1 percre, majd tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 32 napig.
11. Folytassa a szekvenálással.
További információkért lásd: *NextSeq 550Dx készülék referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.

2. opció: Csak DNS-könyvtárak

1. Címkézzzen fel egy mikrocentrifuga-csövet PDL-lel (összevont DNS-könyvtárak).
2. Vigyen át 10 µl-t mindegyik normalizált DNS-könyvtárból az NL lemezről a PDL kémcsőbe.
Ne egyesítsen két könyvtárat ugyanazzal az indexprimerrel.
3. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az NL PCR-lemezre.
Zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
4. Vortex keverővel keverje össze a PDL csövet, majd rövid ideig centrifugálja.
5. Inkubálja a PDL-csövet fűtőblokkon, 96 °C-on, 2 percre.
6. A PDL csövet tárolja hűtve 5 percre.
7. Vortex keverővel keverje össze a PDL csövet, majd rövid ideig centrifugálja.
8. A PDL kémcsövet tárolja hűtve.

Az első hígítás előkészítése

1. Címkézzzen fel egy DIL1 mikrocentrifuga-csövet (1. hígítás).
2. Vigyen át 10 µl PDL-t az üres DIL1 csőbe.
3. Dobja ki a PDL csövet.
4. Adjon 190 µl előhűtött HT1-et a DIL1 csőhöz (1:20 hígítás).
5. Vortex keverővel keverje össze a DIL1-et, majd rövid ideig centrifugálja.

Második hígítás előkészítése

1. Címkézzzen fel egy 2,0 ml-es DIL2 mikrocentrifuga-csövet (2. hígítás).
2. Vigyen át 40 µl DIL1-et az üres DIL2 csőbe.
3. Dobja ki a DIL1 csövet.
4. Adjon 1660 µl előhűtött HT1-et a DIL2 csőhöz (1:850 hígítás).
5. Vortex keverővel keverje össze az előkészített 20 pM dPhiX-et, majd rövid ideig centrifugálja.
6. Adjon 2,5 µl előkészített 20 pM dPhiX-et a DIL2 csőhöz.
7. Vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
8. Töltsön be 1300 µl DIL2-t a kiolvasztott NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2-be (300 ciklus). További információkért lásd: *NextSeq 550Dx készülék referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.
9. Dobja ki a DIL2 csövet.
10. Centrifugálja az NL PCR-lemezt 280g erővel 1 percre, majd tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 32 napig.
11. Folytassa a szekvenálással.
További információkért lásd: *NextSeq 550Dx készülék referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.

3. opció: Csak RNS-könyvtárak

1. Címkézzzen fel egy mikrocentrifuga-csövet PRL-lel (összevont RNS-könyvtárak).
2. Vigyen át 10 µl-t mindegyik normalizált RNS- (cDNS) könyvtárból az NL lemezről a PRL kémcsőbe. Ne egyesítsen két könyvtárat ugyanazzal az indexprimerrel.
3. Helyezze fel a ragasztós lemeztömítést az NL PCR-lemezre.
A párolgás megelőzése érdekében zárja le teljesen a széleket és a cellákat.
4. Vortex keverővel keverje össze a PRL csövet.
5. Centrifugálja röviden a PRL kémcsövet.
6. Inkubálja a PRL-csövet fűtőblokkon, 96 °C-on, 2 percre.
7. A PRL kémcsövet tárolja hűtve 5 percre.

8. Vortex keverővel keverje össze a PRL csövet, majd rövid ideig centrifugálja.
9. A PRL csövet tárolja hűtve.

Az első hígítás előkészítése

1. Címkézzen fel egy DIL1 mikrocentrifuga-csövet (1. hígítás).
2. Vigyen át 10 µl PRL-t az üres DIL1 csőbe.
3. Dobja ki a PRL csövet.
4. Adjon 190 µl előhűtött HT1-et a DIL1 csőhöz (1:20 hígítás).
5. Vortex keverővel keverje össze a DIL1-et, majd rövid ideig centrifugálja.

Második hígítás előkészítése

1. Címkézzen fel egy 2,0 ml-es DIL2 mikrocentrifuga-csövet (2. hígítás).
2. Vigyen át 40 µl DIL1-et az üres DIL2 csőbe.
3. Dobja ki a DIL1 csövet.
4. Adjon 1646 µl előhűtött HT1-et a DIL2 csőhöz (1:843 hígítás).
5. Vortex keverővel keverje össze az előkészített 20 pM dPhiX-et, majd rövid ideig centrifugálja.
6. Adjon 16,7 µl előkészített 20 pM dPhiX-et a DIL2 csőhöz.
7. Vortexeléssel keverje össze, majd rövid ideig centrifugálja.
8. Töltsön be 1300 µl DIL2-t a kiolvasztott NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2-be (300 ciklus).
További információkért lásd: *NextSeq 550Dx készülék referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.
9. Dobja ki a DIL2 csövet.
10. Centrifugálja az NL PCR-lemezt 280g erővel 1 percig, és tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 32 napig.
11. Folytassa a szekvenálással.
További információkért lásd: *NextSeq 550Dx készülék referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.

Az eredmények értelmezése

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat szekvenálási eredményei minden egyes mintára külön-külön PDF-jelentésben és JSON-jelentésben kerülnek jelentésre. A rendszer alacsony mélységű jelentést (`LowDepthReport.tsv`) is generál a minta szintjén.

Futtatási szinten a következő kimeneti fájlok jönnek létre:

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

A PDF- és JSON-jelentésekben csak azok a variánsok jelennek meg, amelyek megfelelnek a minőségellenőrzésnek.

Az elemzéssel kapcsolatos részletes információkat lásd: *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661)*.

Társdiagnosztikai eredmények

Minden társdiagnosztikai (CDx) rendeltetésszerű használat esetén három lehetséges eredmény érhető el:

- **Pozitív**—A rendszer egy variánst vagy biomarkert észlel és 1. szintűnek (CDx) osztályozta.
- **Nem mutatható ki**—A mintában nem mutathatók ki a CDx rendeltetéséhez kapcsolódó variánsok vagy biomarkerek. A mintához kiválasztott tumor típusa megfelel a CDx-nek.
- **Nincs eredmény**—A variáns státusz meghatározása nem lehetséges a következő okok közül egy vagy több miatt:
 - A CDx rendeltetésszerű használata nem alkalmazható a vizsgált mintára, mivel a mintához kiválasztott tumor típusa nem megfelelő a CDx tumortípusához.
 - A szekvenálási futtatás minőségellenőrzési specifikációi sikertelenek voltak.
 - A könyvtár nem felelt meg a szükséges minőségellenőrzési specifikációknak.
 - A megfelelő nukleinsav nem futott.

A CDx rendeltetésszerű használatának összes eredményét a JSON-jelentés Társdiagnosztikai eredmények című részében jelentik. Csak a pozitív eredménnyel rendelkező rendeltetésszerű használatok szerepelnek a PDF-jelentés Társdiagnosztikai eredmények részében.

Tumorprofilozási variánsok

A TSO Comprehensive (EU) szomatikus variánsok jelentésére szolgál, amikor klinikai jelentőséggel bíró variánsokat vagy potenciális klinikai jelentőséggel bíró variánsokat jelentenek. A TSO Comprehensive (EU) vizsgálati szoftver KB-t használ, amely meghatározza, hogy minden egyes észlelt és alkalmas variáns ([2. táblázat](#)) klinikailag jelentős vagy potenciálisan klinikailag jelentős-e a terápia, diagnosztikai vagy

prognosztikai összefüggések bizonyítékai alapján. A KB azt is figyelembe veszi, hogy a vizsgált tumortípusban vannak-e társítások (vagy sem). A KB nem foglalja magában az érzékenységi vagy rákkockázati összefüggéseket. A gyakori polimorfizmusok eltávolításra kerülnek.

A tumorprofilozási variánsok esetében a pozitív eredményeket a telepített KB és az azonosított tumortípus szerint a klinikai jelentőséggel (2. szint) bíró genomikai eredményekhez vagy a potenciális klinikai jelentőséggel (3. szint) rendelkező genomikai eredményekhez sorolják.

A minőségellenőrzési hibák nem vezetnek eredményhez a hibás minőségellenőrzési mérőszámra vonatkozó variánstípusoknál. További információkért lásd a [40. táblázat](#) és a [41. táblázat](#). A nem megfelelő mélységű tumorprofilozási pozíciókat az Alacsony mélységű jelentés sorolja fel, nem pedig a TSO Comprehensive (EU) jelentés.

Minőség-ellenőrzés

- A nukleinsav mennyiségi meghatározásával kapcsolatos információkat és a minimális bemeneti anyag követelményeket lásd a [Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a\(z\) 26. oldalon](#).
- A szekvenálási futtatást és a minta érvényességét a TSO Comprehensive (EU) elemzési modul automatikusan határozza meg és jelenti. Az elemzéssel kapcsolatos részletes információkat lásd: *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661)*.
- A TSO Comprehensive (EU) jelentés, ami PDF- és JSON-formátumban is elérhető, összegzi a minőségellenőrzési eredményeket. A jelentésfájlok az elemzési mappában találhatóak. Lásd: *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661)* az (PDF-és JSON-jelentéseket tartalmazó) elemzési mappa helyére és a futtatási mappára vonatkozóan.

40. táblázat TSO Comprehensive (EU) Eredmény minőségellenőrzési mutatói jelentése

Kimenet típusa	Mérőszám	Műszaki adatok	Leírás	A specifikációs hiba hatása*
Szekvenálási futtatás	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	A szűrő (PF) átmenő értékeinek százalékos aránya.	Szekvenálási futtatások érvénytelenítve. A futtatás egyik mintájához sem jelentettek eredményt.

Kimenet típusa	Mérőszám	Műszaki adatok	Leírás	A specifikációs hiba hatása*
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Az alapazonosítások átlagos százaléka Q30 vagy annál magasabb minőségi pontszámmal az 1. mérésnél.	Szekvenálási futtatások érvénytelenítve. A futtatás egyik mintájához sem jelentettek eredményt.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Az alapazonosítások átlagos százaléka Q30 vagy annál magasabb minőségi pontszámmal a 2. mérésnél.	
DNS-könyvtárak	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 VAGY > 3106 és P_VALUE ≤ 0,049	A gyakori variánsok VAF-je segítségével a szennyeződés valószínűségét értékelő mérőszám. A szennyeződési pontszám az SNP-k VAF-eloszlásán alapul. A kontaminációs P érték a nagy mértékben átrendezett genomok értékelésére szolgál. Csak akkor alkalmazható, ha a szennyeződési pontszám meghaladja a Felső spec határértéket.	Nem jelentettek DNS-eredményeket.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	A minta medián fragmentumhossza.	Nem jelentettek TMB vagy kis DNS-variáns eredményeket.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (szám)	≥ 150	Medián exonfragmentum-lefedés az összes exonalapon.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Százalékos exonbázisok 50X fragmentum lefedettséggel.	

Kimenet típusa	Mérőszám	Műszaki adatok	Leírás	A specifikációs hiba hatása*
	USABLE_MSI_SITES (szám)	≥ 40	Az MSI azonosításhoz használható MSI-helyek száma (azoknak a mikroszatellita-helyeknek száma, amelyeknél elegendő a mért érték a mikroszatellita-instabilitás azonosításához).	Nem jelentettek MSI eredményt.
	COVERAGE_MAD (szám)	$\leq 0,210$	Az egyes CNV-célrégiók normalizált számának mediánjától való abszolút eltérések mediánja.	Nem jelentettek génamplifikációs eredményeket.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (szám)	$\geq 1,0$	A CNV célérték szerinti átlagos nyers tartályszám.	
RNS-könyvtárak	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	A minta medián fragmentumhossza.	Nem jelentettek fúziókat vagy splice-variáns eredményeket.

Kimenet típusa	Mérőszám	Műszaki adatok	Leírás	A specifikációs hiba hatása*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (együtthető)	$\leq 0,93$	A MEDIAN_CV_GENE_500X a lefedettség egységességének mérőszáma. Minden legalább 500-szoros lefedettségű gén esetében kiszámítják a géntestre vonatkozó lefedettség variációs koefficiensét. Ez a mérőszám ezeknek az értékeknek a mediánja. A magas érték magas variációs szintet jelez, és problémát jelez a könyvtár előkészítésében, például alacsony mintabemeneti és/vagy szondalegördülési problémákat. Ez a mérőszám az összes leolvasással számítható ki (beleértve a duplikáltként megjelölt leolvasásokat is).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (szám)	$\geq 9.000.000$	A cél régiókhöz térképező leolvasások összes száma. Ez a mérőszám az összes leolvasással számítható ki (beleértve a duplikáltként megjelölt leolvasásokat is).	

* A sikeres eredmények PASS-t (SIKEREST) mutatnak.

41. táblázat TSO Comprehensive (EU) Eredménykontrolláló mérőszámok jelentése

Kimenet típusa	Mérőszám	Műszaki adatok	A specifikációs hiba hatása*
Pozitív kontroll	DNS külső kontroll	A 24 meghatározott variánsból 23 észlelhető	A kontrollminta eredményei alapján manuálisan érvénytelenítse a betegmintákat. Az elemzőmodul szoftvere nem érvényteleníti automatikusan a betegmintákat a kontrollminta eredményei alapján.
	RNS külső kontroll	A 13 meghatározott variánsból 12 észlelhető	
Nem-sablon kontroll	DNS medián exonlefedettség ehhez: TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	A kontrollminta eredményei alapján manuálisan érvénytelenítse a betegmintákat. Az elemzőmodul szoftvere nem érvényteleníti automatikusan a betegmintákat a kontrollminta eredményei alapján.
	RNS-gén a medián küszöbérték felett	≤ 1	

* A sikeres eredmények PASS-t (SIKEREST) mutatnak.

- Érvénytelen szekvenálási futtatások megisméltése.
- Ismétlje meg a könyvtárak tesztelését a következő eredményekkel:
 - Szennyezett DNS-könyvtárak
 - Érvénytelen RNS-könyvtárak
 - A tesztek megismételhetők, hogy több variáns vagy biomarker-eredményt kapjanak a DNS-könyvtárakhoz, amelyek egy, de nem az összes variánstípusra érvénytelenítettek.
- A pozitív kontrollokat variánsazonosítás esetén értékelik. Ha a pozitív kontrollok nem felelnek meg a variánsazonosítás specifikációinak, manuálisan érvénytelenítse a szekvenálási futtatást. Az elemzőmodul szoftvere nem érvényteleníti automatikusan a betegmintákat a kontrollminta eredményei alapján.
- Az NTC-eket a DNS-medián exonlefedettsége és az RNS-medián metszete feletti gének alapján értékelik. Ha a negatív kontrollok nem felelnek meg a specifikációknak, manuálisan érvénytelenítse a könyvtárelőkészítési eseményt és az összes kapcsolódó szekvenálási futtatást. Az elemzőmodul szoftvere nem érvényteleníti automatikusan a betegmintákat a kontrollminta eredményei alapján.
- Végezzen további minőségellenőrzési intézkedéseket a helyi és/vagy országos előírásokkal vagy akkreditációs követelményekkel összhangban.

A szekvenálási futtatások vagy könyvtárak tesztjeinek megisméltésével kapcsolatos további információkért lásd: [Hibaelhárítás a\(z\) 85. oldalon](#).

Hibaelhárítás

A következő táblázat segítségével elháríthatja a munkafolyamat során felmerülő problémákat. Ha egy minta szekvenálási futtatása vagy könyvtár-előkészítése kétszer sikertelen, további hibaelhárításra van szükség. Vegye fel a kapcsolatot az Illumina műszaki ügyfélszolgálatával.

Megfigyelés	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
A szekvenálási futtatás nem felel meg a minőségellenőrzési specifikációknak	<ul style="list-style-type: none"> • Keverési hiba • Hígítási hiba • A PRL/PDL hődenaturációja nem teljes • Problémák a fogyóeszközök előkészítésének szekvenálásával (például nem megfelelő felolvasztás, páralecsapódás/törmelék az áramlási cellán) 	<ul style="list-style-type: none"> • A Normalizált Könyvtárak (NL) PCR-lemezének reszekvenálási könyvtárai. Lásd: Előkészítés a szekvenáláshoz a(z) 73. oldalon.
	<ul style="list-style-type: none"> • Dúsító próbák helytelen használata (például DNS-mintákhoz használt OPR1 próbák, RNS-mintákhoz használt OPD2 próbák) • Hiba a könyvtár-előkészítési munkafolyamatban az első hibridizációs lépés során vagy azt követően. 	<p>Az Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-lemez könyvtárai újradúsítási lépéseinek megismétlése. Lásd: Az első hibridizáció beállítása a(z) 57. oldalon.</p>
A mintabemenetre vonatkozó követelmények nem teljesültek		<p>A könyvtár előkészítésének megkezdése a munkafolyamat elejétől. Lásd: RNS semlegesítése és lágyítása a(z) 43. oldalon vagy a gDNS fragmentálása a(z) 48. oldalon.</p>
Hiba a könyvtár-előkészítési munkafolyamatban az index PCR lépés alatt vagy előtt		<p>Az Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-lemez könyvtárai újradúsítási lépéseinek megismétlése. Lásd: Az első hibridizáció beállítása a(z) 57. oldalon.</p>

Megfigyelés	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
	Műszerprobléma	Vegye fel a kapcsolatot az Illumina műszaki ügyfélszolgálatával.
Hiba a jelentéskészítésnél vagy általános eszközhiba (pl. hálózati hiba, reagensek betöltése/eltávolítása stb.)	Szoftver- vagy műszerhiba	Lásd: Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661), a jelentéskészítéssel kapcsolatos segítségért. További segítségért forduljon a Illumina műszaki támogatáshoz.
A DNS-könyvtár nem felel meg a minőségellenőrzési specifikációknak	A mintabemenetre vonatkozó követelmények nem teljesültek.	Biztosítsa a megfelelő mintabevitelt, és ismételje meg a könyvtár előkészítését a gDNS fragmentálása lépésből. Lásd: A mintákkal kapcsolatos követelmények a(z) 25. oldalon , valamint a Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a(z) 26. oldalon .
	Használati vagy berendezéshiba a vizsgálat munkafolyamatában.	Ismételje meg a könyvtár előkészítését a következő lépések egyikével, attól függően, hogy hol történt a használat vagy a berendezés hibája. Ha ismeretlen vagy más hiba történt, a futtatás hibaelhárításához lépjen kapcsolatba a Illumina műszaki támogatással. <ul style="list-style-type: none"> • A Normalizált Könyvtárak (NL) PCR-lemezének reszekvenálási könyvtárai. Lásd: Előkészítés a szekvenáláshoz a(z) 73. oldalon. • Az Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-lemez könyvtárai újradúsítási lépéseinek megismétlése. Lásd: Az első hibridizáció beállítása a(z) 57. oldalon. • A könyvtár előkészítésének megkezdése a munkafolyamat elejétől. Lásd: gDNS fragmentálása a(z) 48. oldalon.

Megfigyelés	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
	A CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE kritériumok nem teljesültek.	<p>A keresztszennyeződés elkerülésével kapcsolatos információkért tekintse át a Figyelmeztetések és óvintézkedések részt. Ellenőrizze a lemezelrendezést és a könyvtárindexelést, hogy megbizonyosodjon arról, hogy az azonos indexhez tartozó könyvtárak nem kerültek együtt szekvenálásra.</p> <p>Az érintett könyvtárak esetében kezdje a könyvtár előkészítést a munkafolyamat elején. Lásd: gDNS fragmentálása a(z) 48. oldalon.</p> <p>Szennyeződés léphetett fel a mintaextrakció során. Előfordulhat, hogy meg kell ismételni az extrakciót, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy a minta mentes a szennyeződéstől.</p>
	A használható MSI sikertelen.	<p>Tekintse át az ultrasonikátor gyártójának használati és üzemeltetési beállításait (beleértve a vízszintet és a csőtípust). Gondoskodjon a megfelelő mintabevitelről a vizsgálathoz.</p> <p>Lásd: A mintákkal kapcsolatos követelmények a(z) 25. oldalon, valamint a Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a(z) 26. oldalon.</p> <p>Új mintaextrakcióra és/vagy a gDNS fragmentálása lépés megismétlésére lehet szükség, ha a minta túlságosan fragmentált vagy sérült.</p>

Megfigyelés	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
	<p>A minta túlságosan fragmentált, vagy nukleinsav-károsodása van, ami befolyásolja az elégséges egyedi könyvtárak létrehozásának lehetőségét.</p>	<p>Tekintse át az Ultraszonikátor konfigurációs beállítások DNS-fragmentációhoz a(z) 22. oldal és az ultraszonikátor gyártójának használati és üzemeltetési beállításait (beleértve a víz szintet és a csőtípust). Gondoskodjon a megfelelő mintabevitelről a vizsgálathoz.</p> <p>Lásd: A mintákkal kapcsolatos követelmények a(z) 25. oldal, valamint a Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a(z) 26. oldal</p> <p>Új mintaextrakcióra és/vagy a gDNS fragmentálása lépés megismétlésére lehet szükség, ha a minta túlságosan fragmentált vagy sérült.</p>
<p>Az RNS-könyvtár nem felel meg a minőségellenőrzési specifikációknak.</p>	<p>A mintabemenetre vonatkozó követelmények nem teljesültek.</p>	<p>Biztosítsa a megfelelő mintabevitelt, és ismételje meg a könyvtár előkészítését az RNS semlegesítése és lágyítása lépésből.</p> <p>Lásd: A mintákkal kapcsolatos követelmények a(z) 25. oldal, valamint a Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a(z) 26. oldal</p>

Megfigyelés	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
	<p>Használati vagy berendezéshiba a vizsgálat munkafolyamatában.</p>	<p>Ismételje meg a könyvtár előkészítését a következő lépések egyikével, attól függően, hogy hol történt a használat vagy a berendezés hibája. Ha ismeretlen vagy más hiba történt, a futtatás hibaelhárításához lépjen kapcsolatba a Illumina műszaki támogatással.</p> <ul style="list-style-type: none"> • A Normalizált Könyvtárak (NL) PCR-lemézének reszekvenálási könyvtárai. Lásd: Előkészítés a szekvenáláshoz a(z) 73. oldalon. • Az Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-leméz könyvtárai újradúsítási lépéseinek megisméltése Lásd: Az első hibridizáció beállítása a(z) 57. oldalon. • A könyvtár előkészítésének megkezdése a munkafolyamat elejétől. Lásd: RNS semlegesítése és lágycitása a(z) 43. oldalon.
	<p>Előfordulhat, hogy a minta túlságosan fragmentált, vagy nukleinsav -károsodása van, ami befolyásolja az elégséges egyedi könyvtárak létrehozásának lehetőségét.</p>	<p>Gondoskodjon a megfelelő mintabevitelről. Lásd: A mintákkal kapcsolatos követelmények a(z) 25. oldalon, valamint a Nukleinsav-extrakció, mennyiségi meghatározás és tárolás a(z) 26. oldalon</p> <p>Új mintaextrakcióra lehet szükség, ha a minta túlságosan fragmentált vagy sérült.</p>

Megfigyelés	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
Pozitívkontroll-hiba (DNS/RNS).	A pozitív kontrollhoz a mintabemenetre vonatkozó követelmények nem teljesültek.	<p>Gondoskodjon a megfelelő bevitelről a vizsgálathoz.</p> <p>Ellenőrizze a lemez elrendezését, és győződjön meg arról, hogy a megfelelő reagensek (szondák, indexek) a megfelelő cellákban vannak.</p> <p>Győződjön meg róla, hogy a pozitívkontroll-minta tárolása a címkének megfelelően történt.</p> <p>Minden olyan minta esetben, amely a pozitív kontrollon osztozik, ismételje meg a könyvtár előkészítését a következő lépések egyikével, attól függően, hogy hol történt a használat vagy a berendezés hibája. Ha ismeretlen vagy más hiba történt, a futtatás hibaelhárításához lépjen kapcsolatba a Illumina műszaki támogatással.</p> <ul style="list-style-type: none"> A Normalizált Könyvtárak (NL) PCR-lemezének reszekvenálási könyvtárai. Lásd: Előkészítés a szekvenáláshoz a(z) 73. oldalon. Az Amplified Libraries Samples (ALS) PCR-lemez könyvtárai újradúsítási lépéseinek megismétlése Lásd: Az első hibridizáció beállítása a(z) 57. oldalon. A könyvtár előkészítésének megkezdése a munkafolyamat elejétől. Lásd: RNS semlegesítése és lágyítása a(z) 43. oldalon vagy a gDNS fragmentálása a(z) 48. oldalon.
	Használati vagy berendezéshiba a vizsgálat munkafolyamatában.	

Megfigyelés	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
NTC-hiba (DNS/RNS).	Keresztszennyeződés történt vagy a munkaterület elszennyeződött.	A munkaterületek fertőtlenítésére és a keresztszennyeződés elkerülésére vonatkozó információkat lásd a Figyelmeztetések és óvintézkedések részben. Ellenőrizze a lemezrendezést és a könyvtárindexelést, hogy megbizonyosodjon arról, hogy az azonos indexhez tartozó könyvtárak nem kerültek együtt szekvenálásra. Ismételje meg a könyvtárelőkészítést a munkafolyamat elejéről minden olyan könyvtárra, amely Sablon nélküli kontrollal rendelkezik.
	Könyvtár helytelen indexelése.	
A szoftver azt jelzi, hogy a pozitív és/vagy negatív kontrollok nem szerepeltek a szekvenálási futtatásban.	Tumortípus helytelen hozzárendelése a Local Run Manager futtatás tervezésénél.	A kontrollok helyes azonosításával végezze el ismét az elemzést az Elemzési modul munkafolyamati útmutató szerint (lásd <i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661)</i>).

Teljesítményjellemzők

A TSO Comprehensive (EU) egy célzott NGS-panel, amely 517 génben mutat ki változásokat. A kis DNS-variánsok (egy nukleotidvariáns [SNV-k], több nukleotidvariáns (MNV-k), inszerciók és deléciók) — mind az 517 génből alkalmasak jelentésre. A tumor mutációs terhelését a megabázisonkénti nem vezető szomatikus variánsok száma alapján pontszámként jelentik (a részleteket lásd itt: *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) elemzési modul, Munkafolyamat-útmutató (dokumentumszám: 200008661)*). Az MSI-t státuszként jelentik. A génamplifikációk alkalmasak a MET és az ERBB2 génekből történő jelentésre. A fúziók az [A vizsgálat összefoglalása és magyarázata a\(z\) 1. oldalon](#) részben megadott 23 génről alkalmasak jelentés adására. A splice-variánsok alkalmasak a MET és EGFR génekből történő jelentésre. A jelentéshez a variánsokat ki kell mutatni, és bizonyítékkal kell rendelkezniük a KB TSO Comprehensive (EU) vizsgálatban, és a tesztelt szövettípus alapján alkalmasnak kell lenniük. A jelentéshez az NTRK-fúziókhoz a fúziós partnernek 5'-nek kell lennie, az NTRK-kináz doménnek pedig épnek kell lennie.

Kis DNS-variánsok esetében a panelben a célzott gének validálásának reprezentatív megközelítését végezték el az SNV-eket, MNV-eket, inszerciókat és deléciókat képviselő adatokkal. A génamplifikációk, fúziók és splice-variánsok esetében a vizsgálatot génszinten végezték. A TMB-t és az MSI-t a jelzett helyeken értékelték. Az

NTRK-fúziós CDx-állítások esetében az FFPE-minták fúzióit az igényre jellemző teljesítményre összpontosító vizsgálatokban tesztelték (mint például a detektálási határérték, a laboratóriumon belüli precizitás, a reprodukálhatóság, a pontosság és a klinikai teljesítmény).

A [42. táblázat](#) a különböző vizsgálatokban kiszámított mérőszámok definícióit tartalmazza.

42. táblázat Mérőszámok meghatározása

Kifejezés	Definíció
Pozitív százalékos egyezés (PPA)	Az összes pozitívból helyesen azonosított pozitívok százalékos aránya egy ortogonális módszerhez képest.
Negatív százalékos egyezés (NPA)	Az összes negatívból helyesen azonosított negatívok százalékos aránya egy ortogonális módszerhez képest.
Teljes százalékos megállapodás (OPA)	Az ortogonális módszerhez képest a teljes megfigyelés alapján helyesen azonosított pozitív és negatív eredmények százalékos aránya.
Pozitív azonosítások százalékos aránya (PPC)	Azon megfigyelések százalékos aránya, amelyek pozitívak egy adott célhoz, azon megfigyelések között, amelyek várhatóan pozitívak lesznek a célhoz.
Negatív azonosítások százalékos aránya (PNC)	Azon megfigyelések százalékos aránya, amelyek negatívak a cél szempontjából, azon megfigyelések között, amelyek várhatóan negatívak lesznek a cél szempontjából.
n/N	A pozitív vagy negatív megfigyelések száma (n) osztva az összes megfigyeléssel (N) a PPC, illetve a PNC kiszámításához. Az n és N értékei különböző szinteken (pl. variáns vagy gén) vagy csoporton belül kombinálhatók (pl. SNV-k).
Szórás (SD)	A változó értékeinek változásának mértékének mértéke az átlaga körül.
Százalékos variációs koefficiens (%CV)	A szórást elosztjuk az átlaggal százalékban.

Keresztszennyeződés

A keresztszennyeződési vizsgálatot annak értékelésére végezték, hogy az álpozitív eredmények a mintakönyvtárak előkészítése során az egyik cellából a másikba történő mintaátvitel miatti szennyeződés vagy az egymás utáni futtatások közötti szennyeződés miatt fordultak elő. Ezt az elemzést kis DNS-variánsok (amelyek a TMB-t is érintik), fúziók, génamplifikációk és MSI esetében végezték. Könyvtárakat készítettek a jellemzett mintákból, sakkmintaszerűen felváltva vett mintákkal, hogy értékeljék a cellák közötti szennyeződést, valamint felváltva vett indexekkel, hogy értékeljék a szekvenáló futtatások közötti

szennyeződést, amikor a szekvenálást egymás után ugyanazon a NextSeq 550Dx készüléken végzik. A keresztszennyeződési vizsgálat nulla szennyeződési eseményt mutatott ki az egyes mintákban észlelt variánsok vizsgálatával, álpozitív eredmények kimutatása nélkül.

Két QC-mérőszámot (CONTAMINATION_SCORE és P_VALUE) terveztek a TSO Comprehensive (EU) vizsgálatban a DNS-mintákban lévő mintaszennyeződés kimutatására. Értékelték a szennyezésérzékelés szenzitivitását. Az FFPEtumor DNS-mintákat különböző mennyiségű FFPE normál DNS-mintákkal keverték, hogy szándékosan szennyezett mintákat hozzanak létre.

Összesen 1112 kontaminációs megfigyelést generáltak, és a megfigyelések 95%-ában (1054) észleltek kontaminációt. A detektálási arányt 96%-ra (939/976) növelték, amikor a szennyeződés százalékos aránya 10% és 90% között volt (tömeg/tömeg). A 10% és 90% közötti szennyeződéses 37 megfigyelésből ott, ahol nem mutatták ki a szennyeződést, 12 nem felelt meg annak a lefedettség specifikációnak, hogy kis DNS-variánsokat azonosítson. Az alacsony lefedettség zavarja a szennyeződés kimutatását, de a kis DNS-variánsok esetén nem számoltak be arról, hogy az enyhítené a szennyeződés hatásait. Tizenöt megfigyelés nem felelt meg a génamplifikációs specifikációnak (medián tartálysorszám, QC-metrikus) a génamplifikáció azonosítása szempontjából. A minták esetén nem számoltak be a génamplifikáció eredményéről.

A vizsgálat azt igazolta, hogy a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat várhatóan alacsony keresztszennyeződést okoz celláktól-celláig, illetve futtatástól-futtatásig. Ezek az eredmények a szoftver szennyeződési mutatóival együtt csökkentik a mintaszennyeződés miatti hamis variáns eredmények kockázatát.

Nukleinsav-extrakciós készlet értékelése

Három kereskedelmi forgalomban kapható DNS- és RNS-extrakciós készletet értékelték a TSO Comprehensive (EU) segítségével. A három extrakciós készlet izolálja mind a DNS-t, mind az RNS-t ugyanazon FFPE-szövetmetszetekből. A készletek paraffinmentesítő szerükben és nukleinsavkötő lépésükben különböztek (43. táblázat). Az 1. készlet volt a TSO Comprehensive (EU) teljesítmény meghatározásához használt predomináns extrakciós készlet.

43. táblázat A készlet jellemzői

Készlet	Paraffinmentesítő szer	Nukleinsav kötés
1	Jogvédett	Oszlop
2	Xylol	Oszlop
3	Ásványi olaj	Mágneses gyöngyök

A 44. táblázat és a 45. táblázat összefoglalja az extrakciós készleteknek a könyvtár érvényességére és a variánsok azonosítására gyakorolt hatásait. Ha az extrakciós készlet átlaga jelentősen eltérő volt, a különbséget jelentették. Az extrakciós készletek közötti átlagos különbségeket az 1. készlettel számították ki kontrollként, mivel a TSO Comprehensive (EU) analitikai vizsgálatokhoz használt nukleinsavak nagy részét az 1. készlettel extrahálták. Az 1. készlethez viszonyított átlagos különbség a beszámoló szerint azt mutatja, hogy a különböző extrakciós készletek hogyan befolyásolnák a többi TSO Comprehensive (EU) analitikai vizsgálatot.

44. táblázat Az extrakciós készlet hatásai a könyvtár érvényességére

Variáns típusa	Könyvtár QC mérőszámok	Átlagos különbség az 1. készlethez képest
Kis DNS-variánsok/TMB	Medián exonlefedettség (számmértéke) PCT Exon 50X (%) Medián inszerció méret (bp)	A 2. készlet 56 leolvasással alacsonyabb A 3. készlet 0,298%-kal magasabb A 2. és 3. készlet 3 bp-vel alacsonyabb
DNS MSI	Használható MSI-helyek	A 3. készlet 8 hellyel magasabb
DNS génamplifikáció	MAD-lefedettség (számmértéke) Medián tartálysorszám	A 2. készlet 0,0043-del alacsonyabb A 2. készlet 0,5825-del alacsonyabb, a 3. készlet 0,3086-del magasabb
RNS (Fúziók/splice-variánsok)	Medián inszerció méret (bp) Napló (medián CV Gene500X) Összesítve a célleolvasásokon	A 3. készlet 2 bp-vel magasabb A 2. készlet 0,029-del magasabb Nincs jelentős különbség

A 2. és a 3. extrakciós készlet esetében megfigyelték, hogy megnövekedett az alátámasztó leolvasások száma, így az extrakciós készlet kiválasztása miatt a fúziók és a splice-variánsok az LoD közelében nagyobb valószínűséggel észlelhetők.

45. táblázat Az extrakciós készlet hatásai a variánsazonosításra

Variáns típusa (egységek)	Variánsazonosítás (átlagkülönbség az 1. készlethez képest)
Kis DNS-variánsok (VAF)	Technikailag nem jelentős Célzott variánsok: a készleten belüli variancia alacsony volt a maradékhoz képest Nem célzott variánsok: Nincs jelentős különbség az első két VAF tartályban. Nincs jelentős különbség, ha statisztikai szignifikanciát figyeltek meg.
TMB (mutáció megabázisonként)	Technikailag nem jelentős, a készleten belüli variancia alacsony volt a maradékhoz képest
MSI (instabil helyek %-a)	A 3. készlet 1,9%-kal alacsonyabb az instabil helyeknél
Génamplifikáció (átfedettségi változás)	A 2. készlet (0,06) és 3. készlet (0,08) magasabb átfedettségi változással
Fúzió (alátámasztó leolvasások)	A 2. készlet 51%-os, a 3. készlet pedig 23%-os növekedést mutatott az alátámasztó leolvasásokban
Splice variánsok (alátámasztó leolvasások)	A 2. és a 3. készletben 48%-kal növekedtek az alátámasztó leolvasások

Zavaró anyagok

Értékelték a potenciális endogén és exogén anyagoknak a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat teljesítményére gyakorolt hatását. A nukleinsav-extrakciós folyamat során endogén anyagokat, melanint és hemoglobint, oltottak be a mintákba. Exogén anyagok (etanol, xilol és proteináz-K) voltak jelen a nukleinsav-extrakciós folyamat során, és a könyvtár előkészítése előtt a tisztított nukleinsavba is beoltották őket. Ahol interferenciát figyeltek meg a beoltott proteináz K-val, a proteináz K megnövekedett koncentrációját is értékelték az extrakciós folyamat során. A könyvtár előkészítése során többletindex primereket (15% és 30%) adtak hozzá. Az index primerek kivételével, az agyból, az emlőből, a vastagbélből, a tüdőből, a medulláris pajzsmirigyből, az NSCLC-ből, a petefészekből, a prosztatából, a nyálból, a bőrből, a lágyszövetből és a pajzsmirigy szövetéből származó FFPE-mintákhoz anyagokat adtak hozzá – nyolc mintát extraháltak DNS-elemzéshez, és 13 mintát extraháltak RNS-elemzéshez. Az index primerek esetében a DNS-elemzéshez hat különböző szövettípusból (pajzsmirigy, húgyhólyag, vastagbél) származó FFPE-mintát, az RNS-elemzéshez pedig öt különböző szövettípusból (tüdő, pajzsmirigy, vastagbél, emlő) származó FFPE-mintát használtak. A 16 egyedi minta mindegyikénél volt egy-egy beoltás nélküli endogén kontroll és puffer vagy vízbeoltásos exogén kontroll. A nekrozis hatását az agy-, a vastagbél- és a tüdőszövetekből származó másik nyolc FFPE-mintás halmazon értékelték. Minden nekrozismintánál makrodisszektált nemnekrozis-kontroll volt. Minden interferenciát illetően anyagoként és mintánként négy replikátumot vizsgáltak a TSO Comprehensive (EU) vizsgálatnál, és összehasonlították a megfelelő kontroll feltétellel a kis DNS-variánsok, génamplifikációk, RNS-fúziók és RNS-splice variánsok kimutatása, valamint az MSI-státusz és a TMB-pontszám tekintetében. CDx- és tumorprofilozási variánsokat is tartalmaztak.

DNS-variáns kimutatása

A melanin (0,2 µg/ml), a hemoglobin (2 mg/ml), az etanol (5%), a proteináz-K (0,04 mg/ml nukleinsavban) és a xilol (0,0001%) nem zavarják a TMB-pontszámot, az MSI-státuszt, a kis DNS-variánsokat és a génamplifikációkat.

RNS-variáns kimutatása

Az adatok nem támasztják alá, hogy a melanin (0,2 µg/ml), az etanol (5%) és a xilol (0,0001%) zavarja az RNS-fúziókat vagy a splice-variánsokat. A (2 mg/ml) hemoglobin (csökkent alátámasztó leolvasásokkal) zavarta a MET gén három különböző splice-variánsát. Az AR gén (három különböző minta alapján) és az EGFR gén (egy minta alapján) splice-variánsát nem befolyásolta. Ha a laboratórium RNS-t futtat a vizsgálatnál, akkor kerülni kell, illetve minimalizálni kell a hemoglobinnal rendelkező szövetet, amikor szeleteket nyerne ki a szövetblokkból.

A proteináz K (0,04 mg/ml nukleinsavban) zavarta az RNS-fúziókat és a splice-variánsokat. A proteináz K-t 2,6 mg/ml és 5,2 mg/ml koncentrációval tesztelték az extrahálási folyamat során, ami 2-szerese és 4-szerese a kereskedelmi forgalomban kapható készletben található standard koncentrációnak. A fúziókat 4x gátolták, de a proteináz K-t nem gátolták 2x. A splice-variánsoknál a proteináz K-t 2x gátolták. A proteináz K-t vagy azzal egyenértékű enzimet nem szabad növelni az extrakció során az extrakciós készletben megadott standard koncentrációból.

A splice variánst támogató leolvasások száma 30%-os indexprimer-többlet esetén csökken, míg 15%-os többletnél nem.

Nekrózis

A nekrotikus szövet legfeljebb 70%-os jelenléte nem zavarja a TMB-pontszámot, az MSI-státuszt vagy a kis DNS-variánsokat. Az RNS-variánsok (támogató leolvasások) és a génamplifikáció (hányszoros változás) észlelése csökkent a (területenként) $\geq 25\%$ -os illetve $\geq 23\%$ -os nekrotikus tartalommal rendelkező mintákban a szövet területén. Ha a mintametszetek a teljes szövetterületen $\geq 23\%$ nekrozist tartalmaznak, akkor makrodisszekciót kell végezni a nekrotikus szöveten.

Stabilitás

Valós idejű stabilitás

Valós idejű stabilitást használtak a TSO Comprehensive (EU) vizsgálati készlet eltarthatóságának meghatározásához, ha a címkén szereplő feltételek szerint tárolják. A vizsgálat elrendezése három reagenstétel tesztelésén alapult, és a CLSI EP25-A dokumentumban leírt klasszikus stabilitási vizsgálati elrendezést alkalmazta. A készleteket végső készletezett konfigurációban tárolták a vizsgálat időtartama alatt, a termék címkéjén meghatározott tárolási körülmények között. A fagyasztott készlet komponenseit -15 °C és -25 °C között tárolták. A hűtött készlet komponenseit $2\text{–}8\text{ °C}$ -on tárolták.

A készleteket meghatározott időpontokban tesztelték a megjelenés és a készlet funkcionális kibocsátási kritériumai szempontjából. Ezenkívül a minőségellenőrzési kontrollanyag variánsazonosítási és mintaminőség-ellenőrzési metrikus trendjeit is elemezték. Az eltarthatósági időt minden reagens esetében meghatározták. A lejárat dátumok a gyártás dátuma és az eltarthatósági idő alapján kerülnek kijelölésre. A készlet lejáratát a legkorábban lejárató reagens alapján kerül hozzárendelésre.

A készlet használat közbeni stabilitása

A TSO Comprehensive (EU) tesztkészlet használat közbeni stabilitását standard használati körülmények között értékelték a szavatossági idő alatt, hogy alátámasszák a több készlet felhasználást. A reagenskészletet többszörös fagyasztásnak/kiolvasztásnak vetették alá, és tesztelték, hogy alátámasszák a készlet legfeljebb 4 felhasználását. Ezenkívül összesen 8 RNS- és 8 DNS-könyvtárt készítettek elő 3-szor a támogatott könyvtárak maximális számának vizsgálatához (készletenként 24 RNS- és 24 RNS-könyvtár). Minden tesztelt fagyasztási-kiolvasztási ciklusra és időpontra az összes funkcionális készletkiadási kritérium teljesült. A ≥ 25 hónapos reagensekkel rendelkező FFPE-minták vizsgálatát azért végezték, hogy értékeljék a használat közbeni tesztelés hatását a variánsok azonosítására. A célzott variánsok minőségi elemzése azt mutatja, hogy a használatban lévő események nem befolyásolták a variánsok azonosítását.

A nukleinsav stabilitása

A nukleinsavak (DNS és RNS) stabilitását és a TSO Comprehensive (EU) vizsgálathoz kapcsolódó mennyiségi meghatározásukat több szövettípusból származó FFPE-minták segítségével értékelték. Az FFPE-blokkokat kimetszették, és az összes nukleinsavat egyszerre extrahálták. Az extrahált nukleinsavat alaposan összekeverték, kvantifikálták, ellenőrizték a nukleinsav minőségét, és két készletnyi egyszer használatos csőbe osztották a két időpontban történő lefagyasztáshoz. T0 kontroll (kiindulás) és T1 teszt (≥ 28 nap). Az összes extrahált RNS-t -85 °C és -65 °C között tárolták, és az összes extrahált DNS-t -25 °C és -15 °C között tárolták a jelzett időtartam során, majd a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat során több replikátum és kezelő bevonásával dolgozták fel. A T1 teszt állapotát összehasonlították az MSI állapot, a TMB-pontszám, a génamplifikációk, a kis DNS-variánsok, az RNS-fúziók és az RNS-splice variánsok kontrolljával. Az adatok azt mutatják, hogy a nukleinsavak és a TSO Comprehensive (EU) vizsgálattal való használathoz kapcsolódó mennyiségi meghatározásuk az ajánlott hőmérsékleten tárolva legfeljebb 28 napig stabil (RNS -85 °C és -65 °C között, DNS -25 °C és -15 °C között).

Könyvtári stabilitás

A vizsgálat hat biztonságos leállítási pontjának (lásd [5. táblázat](#)) felhasználásával készült könyvtárak stabilitását több szövettípusból származó FFPE-minták segítségével értékelték. A munkafolyamat végén azonnal sorba rendezték a kontrollkönyvtárakat (T0, nincsenek leállítási pontok). Az azonos könyvtárakból származó aliquotokat a leállítási pontokon tartották -25 °C és -15 °C között az [5. táblázat](#) felsorolt napok támogatására (T1). A T1-et a T0-val hasonlították össze a CDx és tumorprofilozási variánsokkal rendelkező kis DNS-variánsok, TMB, génamplifikációk, MSI, RNS-fúziók és RNS-splice variánsok esetében. Az adatok azt jelzik, hogy a TSO Comprehensive (EU) vizsgálatból létrehozott könyvtárak a használati utasításnak megfelelően stabilak.

Tárgylemezre rögzített FFPE-szövetstabilitás

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálathoz használt, tárgylemezre rögzített FFPE-szövetek stabilitását különböző egyedi mintákból metszett FFPE-blokkok ($5 \mu\text{m}$ -es metszetei) alapján értékelték, tárgylemezre rögzítéssel, majd szobahőmérsékleten (22 °C) tárolták 2 időpontig. Az RNS-t extrahálták és -65 °C és -85 °C között tárolták, a DNS-t pedig extrahálták és -15 °C és -25 °C között tárolták kevesebb mint 1 hétig a vizsgálat előtt. A nukleinsav-anyagot kvantifikálták, majd 24 órán belül feldolgozták a TSO Comprehensive (EU) vizsgálattal minden egyes időpontra vonatkozóan. Minden egyes időpontban több replikátumot és kezelőt teszteltek mintánként a TSO Comprehensive (EU) vizsgálattal, és összehasonlították a T0 időponttal az MSI, TMB, génamplifikációk, kis DNS-variánsok, RNS-fúziók és RNS-splice variánsok esetében, beleértve a CDx és tumor profilozási variánsokat. A variánsazonosítást értékelték, és minden elfogadási kritériumnak megfelelt, jelezve, hogy a TSO Comprehensive (EU) vizsgálathoz használt, tárgylemezre helyezett FFPE-szövetek szobahőmérsékleten legfeljebb 4 hétig (28 napig) stabilak. Megjegyzendő, hogy 4 hét (28 nap) elteltével 10%-os csökkenést észleltek az MSI könyvtár QC érvényességi rátájában a kezelő és a tárolási idő kombinációja miatt. Az RNS-fúziók és a splice variánsok az alátámasztó leolvasások körülbelül 29%-os csökkenését mutatták 4 hétig (28 napig) tartó tárgylemezen történő tárolás után.

Nukleinsav-bemeneti titrálási védelembesorolás

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat nukleinsav-bemenetét 17 szövettípust magában foglaló 33 FFPE-mintából származó DNS vizsgálatával értékelték 10 ng és 500 ng közötti bemeneti szinteken, és 5 FFPE-mintából származó RNS-vizsgálatával 5 szövettípusból 10 ng és 85 ng közötti bemeneti szinteken. A könyvtári minőségellenőrzési mérőszámokat értékelték, és azok mintafüggőek voltak. A DNS-eredmények azt mutatták, hogy néhány, de nem minden DNS-minta minőségellenőrzési mérőszáma reagál a névleges 40 ng-os bemenet feletti megnövekedett bemenetre:

- MEDIAN_INSERT_SIZE nem válaszolt a 30 ng feletti bemenetre.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE pozitív korrelációt mutatott a növekvő bemenettel.
- PCT_EXON_50X a bevitel növelésével 80 ng-ig növekedett.
- USABLE_MSI_SITES a bemenet növekedésével nőtt. Néhány minta, amely kevesebb mint 40 USABLE_MSI_SITES 40 ng-nál, megfelelt a specifikációnak magasabb bemeneteknél, ami lehetővé tenné az MSI-pontszám kiszámítását.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET a bemenet növekedésével nőtt.
- Növekvő bemenet, hogy növelje a COVERAGE_MAD értéket a felső specifikációs határérték felé.

Az RNS-minta minőségellenőrzési mérőszámai 10 ng-ről 40 ng-re nőttek (MEDIAN_INSERT_SIZE és TOTAL_ON_TARGET_READS) vagy csökkentek (MEDIAN_CV_GENE_500X), de általában nem változtak 40 ng és 85 ng között.

Vak határérték

Az álpozitív eredmények százalékos arányát (a teljes várható negatív értékből) FFPE normál vagy jóindulatú, szomszédos szövet ismételt vizsgálatával értékelték, amely nem tartalmazhat szomatikus variánsokat kis DNS-variánsok, génamplifikációk, MSI, RNS- fúziók és RNS-splice-variánsok esetében. Az álpozitív eredményeket nem elemezték TMB-re, mivel nincs klinikai határérték. Hat DNS és 6 RNS FFPE-mintát futtattak kétszer 2 kezelővel, 3 napon keresztül mind a 2 reagenstétel esetében. A minták egy alhalmazát újra összesítették, és újraszekvenálták 3x csak DNS- és 3x csak RNS-formátumban, hogy kiértékeljék az álpozitív eredményeket több, az eszköz által támogatott multiplex konfigurációval. Ezenkívül 30 további RNS-mintát futtattak kétszer, amelyeket 1 reagenstétellel dolgoztak fel, 2 kezelő között osztva. Összesen 168 lehetséges megfigyelés történt a DNS-re és 228 megfigyelés az RNS-re vonatkozóan, amelyet az egyes variánstípusokhoz tartozó érvénytelen könyvtárak csökkentettek. Az álpozitív eredmények százalékos arányát génszinten számították ki az amplifikációk esetében, és pozíciószinten (körülbelül 1,9 millió pozíció) a kis DNS-variánsok esetében. Az álpozitív eredmények százalékos arányát a DNS-variáns típusok esetében a [46. táblázat](#) mutatja be. A TSO Comprehensive (EU) nem rendelkezik CDx (1. szint) jellemzőkkel a kis DNS-variánsokra vonatkozóan, így az 1. szinten nem lehet álpozitív kis DNS-variánsokat jelenteni. A 271 álpozitív eredményt a TSO Comprehensive (EU) tudásbázis (Knowledge Base.) szintezte. Egyetlen álpozitív sem volt klinikailag szignifikáns (2. szint). A 3. szinten 4 hamis pozitív eset fordult elő, amely 2 variánsból származott, a 168 megfigyelésből 4 esetben (2,4%).” Az RNS-fúziók és a splice-variánsok álpozitív értékeinek százalékos aránya 0% volt, amint azt a [47. táblázat](#) mutatja.

46. táblázat Álpozitív eredmények DNS-variánstípus szerint

Variáns típusa	Álpozitívak
Génamplifikációk	0% (0/9912)
Kis DNS-variánsok	0,0001% (271/295 801 567)
MSI	0% (0/156)
TMB	NA*

* Az álpozitív eredmények nem alkalmazhatók, mivel a TMB-t pontszámként jelentik, és nincs kvalitatív kimenetele.

47. táblázat Álpozitív eredmények RNS-variánstípus szerint

Variáns típusa	Álpozitívak
Fúzió	0% (0/227)
Splice-variáns	0% (0/227)

Kimutatási határérték

Két vizsgálatot végeztek a kimutatási határértékek értékelésére a TSO Comprehensive (EU) esetében. Az 1. vizsgálat a RET kis DNS-variánsait, a RET fúziókat és az NTRK1–3 fúziókat értékelte. A 2. vizsgálat egyéb tumorprofilozási variánsokat értékelt.

1. vizsgálat

Az NTRK1, NTRK3 és RET kis DNS-variánsok és az NTRK1–3 és RET fúziók kimutatási határértékeit (LoDs) határozták meg. Az LoD a legalacsonyabb analítérték (például variáns allélgyakoriság vagy alátámasztó leolvasások), amely következetesen kimutatható (95%-os detektálási határérték vagy 5%-os II. típusú hiba). A vizsgálatban RET kis DNS-variánsokkal (medulláris pajzsmirigyrák), RET fúziókkal (papilláris pajzsmirigyrák, atípusos Spitz tumor) és NTRK1–3 fúzióval (alacsony fokú glioma, glioblastoma multiforme, myofibroblasztikus szarkóma, szarkóma, szekréción emlőrák, vastagbélrák) rendelkező FFPE-szöveteket, valamint NTRK1 és NTRK3 kis DNS-variánsokat tartalmazó FFPE-kezelt sejtvonalat használtak. Mindegyik mintát legalább 5 tesztszintre hígították (körülbelül 0,01–0,10 VAF között kis DNS-variánsok esetén és 2–25 alátámasztó kiolvasás fúziók esetén). 3 kezelő és 3 szekvenálási műszer által létrehozott variánsenként tételenként 18 megfigyelés történt a könyvtárelőkészítést elindító 3 nem egymást követő napon, minden egyes mintatesztszint 2 ismétlésével. Két reagenstételt teszteltek.

A DNS-variánsok esetében a 2 tételt függetlenül elemezték probit regresszióval vagy a találati arány megközelítéssel (legalacsonyabb tesztszint \geq 95%-os találati arány (pontbecslés)) az egyes variánsok LoD értékének tételenkénti meghatározásához. A két reagenstétel nagyobb LoD-értékét vették fel a variáns kimutatási határértékeként (48. táblázat).

RNS-fúziók esetén FFPE-sejtvonalakat használtak az egyes fúziós gének LoD értékeinek becslésére. Az LoD-okat ezután FFPE-szövetekkel ellenőrizték duplikált könyvtárelőkészítésekkel 3 kezelő, 3 műszer és 3 reagenstétel segítségével, hogy variánsoként 54 megfigyelést hozzanak létre az FFPE-sejtvonalakkal létrehozott LoD közelében. Az egyes fúziók esetében a megállapított kimutatási határértékek (49. táblázat) a legalacsonyabb átlagos alátámasztó leolvasások, amelyek elérték a találati arányt (pontbecslés) $\geq 95\%$.

48. táblázat Az NTRK1, NTRK3 és RET kis DNS-variánsok kimutatási határértékei

Marker	Kr ¹	Elhelyezkedés	Referencia	Alternatíva	Kimutatási határérték (Variáns allélgyakoriság)
NTRK1 G595R (SNV) ²	1. kr.	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV) ²	15. kr.	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV) ²	15. kr.	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV) ²	15. kr.	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	10. kr.	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	10. kr.	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	10. kr.	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (deléció) ²	10. kr.	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Kr. = kromoszóma

² Ezeket a DNS-variánsokat probit regresszióval elemezték; a többi DNS-variánst a találati arány megközelítéssel elemezték.

49. táblázat Az NTRK és RET fúziók kimutatási határértéke

Gén	Fúzió	Kimutatási határérték (Alátámasztó leolvasások)
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

2. vizsgálat

A TSO Comprehensive (EU) által jelentett tumorprofil-variánsok kimutatási határértékeit (LoD-k) értékelték. Az LoD a legalacsonyabb analitérték (variáns allélgyakoriság, átfedettségi változás vagy alátámasztó leolvasások), amely következetesen kimutatható (95%-os találati arány vagy 5%-os II. típusú hiba). A variánsokat tartalmazó 17 szövettípusból származó FFPE-mintákat több tesztszintre hígították. Szintenként hat megfigyelést hozott létre két kezelő, akik különböző reagenstételeket és műszereket használtak.

DNS-variánsok

10 kis DNS-variáns osztály (összesen 25 variáns) és 2 DNS-gén amplifikáció (ERBB2 és MET) LoD-értékét határozták meg és összegezték tartományokként (50. táblázat). Az 1. vizsgálat LoD-variánsait is tartalmazza. Az 5 bp-nél nagyobb 3 inszerció közül kettőnél 0,034 és 0,036 VAF volt az LoD, a harmadiknál pedig 0,215 VAF volt az LoD. Az utóbbi egy alacsony komplexitású régióban történt inszerció, ahol az inszerció további ismétléseket tesz lehetővé, befolyásolja az igazítást, és több leolvasást igényel a következetes kimutatáshoz. Ezért bizonyos alacsony komplexitású genomikai kontextusok befolyásolhatják a > 5 bp inszerciók észlelését.

50. táblázat Kis DNS-variánsok és génamplifikációk kimutatási határértéke

Típus (mértékegység LoD-hoz)	Variánsosztály / genomikai kontextus	Variánsok száma	Tartomány (VAF)
Kis DNS-variánsok (variáns allélgyakoriság)	SNV-k	5	0,016–0,064
	MNV-k	3	0,022–0,048
	Inszerció (1–2 bp) homopolimer ismétlődések közelében	2	0,086–0,104
	Inszerció (1–2 bp) dinukleotid ismétlődések közelében	2	0,038–0,051
	Inszerció (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Inszerció (> 5 bp és legfeljebb 25 bp)	3	0,034–0,215
	Deléció (1–2 bp) homopolimer ismétlődések közelében	2	0,094–0,100
	Deléció (1–2 bp) dinukleotid ismétlődések közelében	2	0,033–0,070
	Deléció (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Deléció (> 5 és legfeljebb 25 bp)	2	0,047–0,055
Génamplifikációk (hányszoros változás)	Gén szerint (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

A nem célzott variánsok elemzését az 1. vizsgálat mintáiból végezték, amelyek legalább öt vizsgálati szinttel rendelkeztek. Mindegyik nem célzott variánst külön-külön elemezték, és az LoD becslésre csak a legalább egy szint >0% és ≤ 95% találati aránnyal és legalább egy szint ≥ 95% találati aránnyal rendelkező variánsok esetében került sor. Az 51. táblázat a percentiliseket, valamint a nem célzott variánsok osztályonként megfigyelt minimális és maximális LoD-értékeit mutatja. A nem célzott variánsok osztályonként több variánst biztosítanak, mint amennyit a 2. vizsgálatban teszteltek, és konzisztensek az 50. táblázat LoD-tartományaival.

51. táblázat Összegző statisztika a nem célzott variánsok osztálya szerinti kimutatási határokhoz (1. vizsgálatból)

Osztály	N	Minimális	25%	50%	75%	90%	Maximális
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
Inzerció	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Deléción	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Fúziók

Az LoD-értékeket 19 fúzióra határozták meg, 20 gént számítva a TSO Comprehensive (EU) panelben, amelyek 9 és 31,3 közötti tartományban voltak az alátámasztó leolvasások alapján (52. táblázat). A másik vizsgálatban további 3 gént (NTRK1 – 3) teszteltek. A RET gént itt és a másik vizsgálatban tesztelték. Tizenhat LoD-vel rendelkező fúziónál az adatok összeegyeztethetők voltak a 16 alátámasztó leolvasásból álló közös LoD-vel, kétoldalas, 95%-os felső konfidencia-határértéket (UCL) használva. A két fúzió LoD értéke 24,7 és 31,3 volt, ami nem felelt meg a közös LoD értéknek.

Az FGFR2-SRPK2 fúzió 24,7 alátámasztó leolvasási LoD értékkel ismételt átfedési régiókkal rendelkezett a töréspontban, ahogy azt a TSO Comprehensive (EU) vizsgálati szoftver megjegyzéssel látta el. Egy törésponton belül az ismétlődő régiók általában alacsonyabb szintű bizonyítékokkal rendelkeznek, mivel a leolvasások a genom más részeit térképezhetik fel, vagy nem igazodnak egymáshoz. Ezenkívül az ismételt régiók megnehezítik az összeszerelési folyamatot (a fúziós szekvenciák azonosítására használják), és további bizonyítékokat igényelnek a helyes szekvencia felépítéséhez. A SEPT14-EGFR egy másik példa a töréspontban homológ szekvenciájú fúzióra.

A 31,3 LoD értékkel rendelkező fúziós BCL2-IGHJ5 alátámasztó leolvasások nagyon rövid génnel (IGHJ5) rendelkeztek, ahol a töréspont egy hasadékkolt rövid illesztéseket igénylő exon kezdete közelében volt. Következésképpen több leolvasásra volt szükség a következetes kimutatáshoz.

52. táblázat A fúziók kimutatási határértéke

Fúzió	„A” gén töréspontja	„B” gén töréspontja	LoD	Közös LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	igen
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	igen
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	igen
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	igen
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	igen
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	igen
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	igen

Fúzió	„A” gén töréspontja	„B” gén töréspontja	LoD	Közös LoD
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	igen
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	igen
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	igen
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	nem
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	igen
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	igen
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	igen
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	igen
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	igen
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	igen
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	nem
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	igen

Splice-variánsok

A két RNS-splice-variáns, a MET és az EGFR LoD alátámasztó értéke 18,7, illetve 16,7 volt.

Tumor tartalma

A vizsgálat eredményei ismertetik a klinikai minták tumortartalmára vonatkozó ajánlásokat. Általában minél nagyobb a tumortartalom, annál nagyobb a jel (VAF, átfedtségi változás vagy alátámasztó leolvasások) a tumorban lévő variánsok esetében. A minimális tumortartalomra vonatkozó ajánlások az alábbi megfigyeléseken alapulnak. A kis DNS-variánsok LoD értékei nem nagyobbak 0,104 VAF-nél (kivéve a TP53 behelyezését). A tumorban lévő driver mutációk kimutatásához (0,50 variáns allélgyakoriság) 20%-os tumortartalom ajánlott, hogy ezek a mutációk 0,10 VAF-vel rendelkezzenek, és LoD-on vagy afelett legyenek. A 20%-os tumortartalom mellett az 5,5-szeres változásra amplifikált gének (11 kópia) következetesen kimutatásra kerülnének az 1,8-szeres átfedtségi változás észlelési határa alapján. 20%-os tumortartalom mellett a 74 támogató leolvasással rendelkező fúziókat következetesen 14,7 támogató leolvasás kimutatási határértéke alapján mutatná ki.

Reprodukálhatóság

Két vizsgálatot végeztek a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat reprodukálhatóságának értékelésére. Az 1. vizsgálat az NTRK és RET fúziós variánsok mellett a RET kis DNS-variánsokat értékelt. A 2. vizsgálat további tumorprofilozási variánsokat értékelt.

1. vizsgálat

Ezt a vizsgálatot azért végezték, hogy értékeljék a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat reprodukálhatóságát 3 vizsgálóhelyen (1 belső, 2 külső), vizsgálóhelyenként 2 kezelővel, 2 futtatáson belüli replikátummal és 3 nem egymást követő tesztelési nappal. A tesztelést egy reprodukálhatósági panellel végezték, amely specifikus ismert RET kis DNS-variánsokat tartalmazó DNS-mintákat és specifikus ismert NTRK1–3 és RET fúziós variánsokat tartalmazó RNS-mintákat tartalmazott formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetmintákból és sejtvonalakból. A panel alacsony variánsszinttel és magas variánsszinttel rendelkező DNS- és RNS-paneltagokat tartalmazott, mindegyik variánsosztály esetében azonos számú alacsony és magas kategóriájú paneltaggal. A magas szintű paneltagok az LoD körülbelül 2-3-szorosát, az alacsony szintű paneltagok pedig körülbelül az LoD-t célozták meg. Minden vizsgálóhelyen, minden kezelő két példányban tesztelte a paneltagokat 3-szor, célonként 6 megfigyelést generálva paneltagonként. Mindhárom vizsgálóhelyről paneltagonként 36 megfigyelést generáltak (3 vizsgálóhely/készülék × 2 kezelő × 2 futtatáson belüli replikátum × 3 kezdési nap).

Elsődleges végpontként a célzott kis DNS-variánsok és a célzott RNS-fúziós variánsok PPC és PNC azonosításait határozták meg magas szinten. A célzott kis DNS-variánsok és az alacsony szintű célzott RNS-fúziós variánsok PPC-it és PNC-it másodlagos végpontokként számították ki. A kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumok (CI-k) az összes végponthoz kapcsolódóan a Wilson-pontszám módszerrel lettek számítva. Elsődleges elemzéseket végeztek a PPC és a PNC (hozzátartozó 95%-os CI-kkel) becslésére a célzott magas szintű paneltagokban, egy adott célhoz tartozó TSO Comprehensive (EU) vizsgálati megfigyelések kombinálásával az adott variánsosztályt képviselő paneltagok csoportjában (például kis DNS-variánsok és RNS-fúziók) a különböző vizsgálóhelyek/műszerek, kezelők és futtatások között. Minden egyes célzott variáns esetében a más paneltagok magas szintű, ugyanahhoz a variánstípushoz célzott, de a többségi szabály által meghatározott variánst nem tartalmazó TSO Comprehensive (EU) vizsgálati megfigyeléseit kombinálták a számított PNC-vel. Az általános PPC és PNC az alacsony szintű célzott panelelemekre vonatkozóan hasonló módon került meghatározásra.

RET kis DNS-variánsok

A magas szintű kis DNS-variáns panelelemek teljes PPC-értéke 100,0% volt (207/207; 95% CI: 98,2% - 100,0%) (53. táblázat). A magas szintű kis DNS-variáns panelelemek teljes PNC-értéke 100,0% volt (1035/1035; 95% CI: 99,6% - 100,0%) (54. táblázat). Az alacsony szintű célzott kis DNS-variáns paneltagok esetében a teljes PPC az alacsony szintű célzott kis DNS-variáns paneltagok esetében 99,1% volt (210/212; 95% CI: 96,6% - 99,7%), a teljes PNC pedig 100,0% (1026/1026; 95% CI: 99,6% - 100,0%).

53. táblázat A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PPC-je a RET kis DNS-variánsok kimutatásához magas és alacsony szintű, célzott panelelemeknél

Variánsszint	Variáns típusa	Célzott variáns (nukleotid)	Célzott variáns (aminosav)	N	Átlagos VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Deléció	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Inzerció	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Összes kis DNS változatok magasak	Összes kis DNS változatok magasak	Összes kis DNS változatok magasak	207	N/A ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Deléció	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Inzerció	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Összes kis DNS változatok alacsonyak	Összes kis DNS változatok alacsonyak	Összes kis DNS változatok alacsonyak	212	N/A ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Rövidítések: N/A, nem alkalmazható; VAF, variánsallél gyakorisága.

² 95%-os kétoldalas konfidencia-intervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

54. táblázat A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PNC-je a RET kis DNS-variánsok kimutatásához magas és alacsony szintű, célzott panelelemeknél

Variánsszint	Variáns típusa	Célzott variáns (nukleotid)	Célzott variáns (aminosav)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Deléció	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Inzerció	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Összes kis DNS változatok magasak	Összes kis DNS változatok magasak	Összes kis DNS változatok magasak	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)
	Deléció	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Inzerció	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Összes kis DNS változatok alacsonyak	Összes kis DNS változatok alacsonyak	Összes kis DNS változatok alacsonyak	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Az összes megfigyelés összevonva olyan paneltag-változó kombinációkból, amelyeknél a többségi azonosítás negatív (a célzott variánsok fúziókat tartalmaznak, és kevesebb mint 50%-uk ad pozitív eredményt).

² 95%-os kétoldalas konfidencia-intervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Az [55. táblázat](#) a variánsallél-gyakoriságok (VAF-ek) varianciakomponenseinek elemzését mutatja be a panel minden egyes tagja esetében körülbelül 36 megfigyelésen keresztül. Kiszámították a szórást (SD) és a százalékos variációs együtthatót (%CV; összes és mindegyik forrásra) minden egyes célzott RET kis DNS-variánsra.

55. táblázat TSO Comprehensive (EU) A VAF vizsgálat varianciakomponenseinek elemzése a célzott kis DNS-variánsok paneltagjainál

Variáns szint	Variáns típusa	Célzott variáns (nukleotid)	Célzott variáns (aminosav)	N	Átlagos VAF	Vizsgálóhelyi SD (%CV)	Kezelő SD (%CV)	Nap SD (%CV)	Replikátum SD (%CV)	Teljes 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)
	Deléció	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)
	Inzerció	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)
	Deléció	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)
	Inzerció	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 és RET fúziók

A magas szintű RNS-fúziós panelelemeknél a teljes PPC-érték 99,3% volt (285/287; 95% CI: 97,5% - 99,8%) (56. táblázat). A PPC 100% volt minden magas szintű panelelemnél, kivéve a BCAN-NTRK1 panelelemet (PPC = 94,4% [34/36; 95% CI: 81,9% – 98,5%]). A magas szintű RNS-fúziós panelelemek teljes PNC-értéke 100,0% volt (1724/1724; 95% CI: 99,8% - 100,0%) (57. táblázat). Az alacsony szintű célzott RNS-fúziós panelelemek esetében a teljes PPC 95,4% volt (272/285; 95% CI: 92,3%, 97,3%), a teljes PNC pedig 100,0% (1851/1851; 95% CI: 99,8% - 100,0%).

56. táblázat A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PPC-je az NTRK és RET fúziók kimutatásához magas és alacsony szintű, célzott panelelemeknél

Variáncsszint	Célzott fúzió	N	Átlagos alátámasztó leolvasások	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)
	Minden fúzió magas	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 (29/36)	(65,0, 90,2)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 (35/36)	(85,8 99,5)
	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 (33/34)	(85,1, 99,5)
	Minden fúzió alacsony	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3 97,3)

* 95%-os kétoldalas konfidencia-intervallumok (CI) a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

57. táblázat A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PNC-je az NTRK és RET fúziók kimutatásához magas és alacsony szintű, nem célzott panelelemeknél

Variáns szint	Célzott fúziók	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% CI ²
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Minden fúzió – magas	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Minden fúzió – alacsony	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Az összes megfigyelés összevonva olyan paneltag-változó kombinációkból, amelyeknél a többségi azonosítás negatív (a célzott variánsok fúziókat tartalmaznak, és kevesebb mint 50%-uk ad pozitív eredményt).

² 95%-os kétoldalas konfidencia-intervallumok (CI) a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

Az 58. táblázat az alátámasztó leolvasások varianciakomponenseinek elemzését mutatja be az egyes célzott fúziók körülbelül 36 megfigyelésén belül. Az SD-t és a %CV-t (összesen és minden forrásra) minden egyes célzott fúzióra kiszámították és bemutatták.

58. táblázat TSO Comprehensive (EU) A vizsgálati variáció összetevőinek elemzése az alátámasztó leolvasások tekintetében a célzott RNS-fúziós panel tagjainál

Variáncsszint	Fúzió	N	Átlagos alátámasztó leolvasások	Vizsgálóhelyi SD (%CV)	Kezelő SD (%CV)	Nap SD (%CV)	Replikátum SD (%CV)	Teljes 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)

2. vizsgálat

Egy második vizsgálatot végeztek a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat reprodukálhatóságának értékelésére 3 vizsgálóhelyen (2 külső és 1 belső), vizsgálóhelyenként 2 kezelővel/készüléken, 3 egyedi reagenstételen, 4 vizsgálati napon (nem egymást követő) és 2 szekvenálási futtatáson mintakönyvtárként.

A tesztelést 41 FFPE-szövetmintából és 1 FFPE-sejtvonalból extrahált DNS- és RNS-mintákkal végezték (1 FFPE-szövetmintával és 2 paneltag létrehozásához használt FFPE-sejtvonallal). A szövetminták a következő típusokból álltak: húgyhólyag, csont, agy, emlő, vastagbél, éhbél, vese, máj, tüdő, petefészek, prosztata, bőr, légyszövet, gyomor, pajzsmirigy és méh. Összesen 44 panelelemet teszteltek, beleértve a DNS-panelelemeket kis DNS-variánsokkal (SNV-k, MNV-k, inszerciók és deléciók), génamplifikációkkal, különböző TMB-pontszámokkal, magas MSI-pontszámokkal és RNS-paneltagokkal fúziókkal és splice-variánsokkal. A paneltagok többségénél ismert célvariánsok voltak a variáns-specifikus kimutatási határérték (~2–3xLoD) kb. 2-3-szorosának megfelelő szinteken.

Az LoD az analit olyan koncentrációja, ahol a megfigyelt vizsgálati eredmények pozitívak (a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat határértékéhez képest észlelt változó) az idő $\geq 95\%$ -ában. Az átlagos megfigyelt

variánsszintek kategóriái körülbelül $< 2 \times \text{LoD}$ ($< 1,5 \times \text{LoD}$ megfigyelt variánsszintek esetén), $\sim 2-3 \times \text{LoD}$ ($1,5 \times \text{LoD}$ és $3,4 \times \text{LoD}$ megfigyelt variánsszintek között) és körülbelül $> 3 \times \text{LoD}$ ($> 3,4 \times \text{LoD}$ megfigyelt variánsszintek esetén).

A kis DNS-variánsok, génamplifikációk, MSI-magas és RNS-variánsok PPC-it a megfigyelések szekvenálási futtatások és vizsgálóhelyek közötti kombinálásával számították ki. A PNC-eket hasonlóan számították ki a kis DNS-variánsok, a génamplifikációk és az RNS-variánsok esetében. Minden ismert célvariáns esetében az azonos variánstípusú, de más variánsokat tartalmazó paneltagok TSO Comprehensive (EU) vizsgálati megfigyeléseit, amelyek nem ugyanabból a forrásmintából származtak, és nem feleltek meg az adott variáns többségi szabályának (az azonosítások $< 50\%$ -a volt pozitív), a vizsgálóhelyek, kezelők/műszerek, napok, reagenstételek és szekvenálási futtatások között kombinálták a PNC kiszámításához. A kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumok (CI-k) a Wilson-pontszám módszerrel lettek számítva.

Kis DNS-variánsok

Az [59. táblázat](#) a célzott kis DNS-variánsok PPC-it mutatja. A PPC-k 91,3% között voltak a BRAF SNV-knél, és 100% között a kisméretű DNS-variánsok többségénél.

59. táblázat A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PPC-je a kis DNS-variánsok kimutatásához kombinált, célzott panelelemeknél

Megfigyelt variánsszint ¹	Variáns típusa	Célzott variáns (nukleotid)	Célzott variáns (aminosav)	Átlagos VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
$\sim 2-3x$ LoD	DELÉCIÓ	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
$\sim 2-3x$ LoD	DELÉCIÓ	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
$\sim 2-3x$ LoD	INZERCÍÓ	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3,100,0)
$\sim 2-3x$ LoD	INZERCÍÓ	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs *9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
$< 2x$ LoD	INZERCÍÓ	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
$\sim 2-3x$ LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
$\sim 2-3x$ LoD	DELÉCIÓ	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)

Megfigyelt variánsszint ¹	Variáns típusa	Célzott variáns (nukleotid)	Célzott variáns (aminosav)	Átlagos VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	DELÉCIÓ	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	INZERCÍÓ	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	INZERCÍÓ	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	DELÉCIÓ	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INZERCÍÓ	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	INZERCÍÓ	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ A megfigyelt átlagos variáns allélgyakoriságból számított variánsszint.

² A megfigyelt vizsgálati eredményekből számított átlagos variáns allélgyakoriság.

³ Kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

A PNC-k 100%-osak voltak a kis DNS-variánsokban.

A 60. táblázat a VAF-eredmények varianciakomponens-elemzését mutatja be az egyes variációs forrásokra és az összes variációra az összes panelelemben, a célzott kis DNS-variánsokkal.

60. táblázat A VAF varianciakomponens-elemzése a célzott kis DNS-variánsok esetében

Célzott variáns (nukleotid)	N	Átlagos VAF	Vizsgálóhelyi SD (%CV)	Kezelő (vizsgálóhely) SD (%CV)	Nap (vizsgálóhely, kezelő) SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Futtatás SD (%CV)	Teljes 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)

Két kis DNS-célzott variáns volt, amelyeknél a megfigyelések száma túl kicsi volt ahhoz, hogy egy varianciakomponens-modellt lehessen illeszteni. E két megcélzott variáns esetében a teljes SD 0,027 volt a chr1_27024001_C_CG variánsnál és 0,001 a chr17_7578470_C_CGGGCGG variánsnál.

Génamplifikációk

A [61. táblázat](#) a célzott génamplifikációk PPC-it mutatja. A PPC 100,0% volt a MET és 100,0% az ERBB2 esetében.

61. táblázat A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PPC-je a génamplifikációk kimutatásához kombinált, célzott panelelemeknél

Megfigyelt variáns szint ¹	Célzott variáns	Megfigyelt átfedettségi változás középértéke ²	Pozitív azonosítások százalékos aránya (%)	95% CI ³
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ A megfigyelt átfedettségi változási középérték alapján kiszámított variáns szint.

² A megfigyelt vizsgálati eredményekből számított átlagos átfedettségi változás.

³ Kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

A PNC-k 100%-osak voltak a génamplifikációk között.

A [62. táblázat](#) bemutatja az átfedettségi változás eredményeinek varianciakomponens-elemzését az egyes variációs forrásokra és az összes variációra vonatkozóan az összes panelemben, a célzott génamplifikációkkal.

62. táblázat A célzott génamplifikációk varianciakomponens-elemzése átfedettségi változás esetén

Célzott variáns	N	Átlagos átfedettségi változás	Vizsgálóhelyi SD (%CV)	Kezelő (vizsgálóhely) SD (%CV)	Nap (vizsgálóhely, kezelő) SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Futtatás SD (%CV)	Teljes 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

A [63. táblázat](#) a célzott MSI-magas panelelemek PPC-it mutatja. A PPC-k 100%-osak voltak mindkét MSI-magas paneltag esetében.

63. táblázat A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PPC-je az MSI-magas státusz kimutatásához kombinált, célzott panelelemeknél

Paneltag	Átlagos MSI pontszám ¹	N	Pozitív azonosítások százalékos aránya (%)	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)
Minden tag		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ A megfigyelt vizsgálati eredményekből kiszámított átlagos megfigyelt MSI pontszám.

² Kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

A [64. táblázat](#) bemutatja az MSI pontszám eredményeinek varianciakomponens-elemzését az egyes variációs forrásokra és az összes variációra vonatkozóan az összes, MSI-magas státuszhoz célzott panelelemben.

64. táblázat Az MSI pontszám eltérési összetevőinek elemzése a célzott MSI-magas paneltagok esetében

Paneltag	N	Átlagos MSI pontszám	Vizsgálóhelyi SD (%CV)	Kezelő (vizsgálóhely) SD (%CV)	Nap (vizsgálóhely, kezelő) SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Futtatás SD (%CV)	Teljes 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

A TMB-pontszámok reprodukálhatóságának értékeléséhez a pontszám kvantitatív elemzését végezték el a TMB panel célzott tagjaiban, ami a várt TMB-pontszámok tartományát jelentette. A [65. táblázat](#) bemutatja a TMB-pontszám eredményeinek varianciakomponens-elemzését az egyes variációs forrásokra és az összes variációra vonatkozóan a TMB-paneltagokban. A TMB összpontszám teljes szórása 1,0 (%CV = 13) volt az egyik paneltagnál (átlagos TMB-pontszám = 7,6) és 1,1 (%CV = 2) a másik paneltagnál (átlagos TMB-pontszám = 63,2).

65. táblázat A TMB-pontszám eltérési összetevőinek elemzése a célzott TMB-paneltagok esetében

Paneltag*	N	Átlagos TMB-pontszám	Vizsgálóhelyi SD (%CV)	Kezelő (vizsgálóhely) SD (%CV)	Nap (vizsgálóhely, kezelő) SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Futtatás SD (%CV)	Teljes 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)

* TMB-paneltag volt, amelyhez a megfigyelések száma túl kicsi volt ($N = 2$) egy illesztendő varianciakomponensmodellhez. Ennél a paneltagnál a teljes szórás 1,7 volt.

RNS-variánsok

Az 66. táblázat a célzott RNS-variánsok PPC-it mutatja. A PPC-k a KIF5B-RET esetében 91,7%-tól a legtöbb RNS-variáns esetében 100%-ig terjedtek.

66. táblázat A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PPC-je az RNS-variánsok kimutatásához kombinált, célzott panelelemeknél

Megfigyelt variánsszint ¹	Variáns típusa	Célzott variáns	Átlagos alátámasztó leolvasások ²	PPC (%) (n/N)	95% CI ³
> 3x LoD	Fúzió	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzió	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzió	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzió	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzió	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzió	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzió	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3x LoD	Fúzió	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzió	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzió	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fúzió	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzió	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzió	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fúzió	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2x LoD	Fúzió	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Fúzió	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3x LoD	Splice - variáns	EGFR VIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3x LoD	Splice - variáns	MET 14. exon átugrása	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ A megfigyelt átlagos alátámasztó leolvasásokból számított variánsszint.

² A megfigyelt vizsgálati eredményekből számított átlagos alátámasztó leolvasások.

³ Kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumok a Wilson-pontszám módszerrel számítva.

A PNC 100% volt minden egyes célzott RNS-variáns esetében, kivéve az FGFR2-SRPK2 fúziót (PNC = 99,60% (984/988; 95% CI: 98,96% - 99,84%).

A 67. táblázat az egyes variációs források és az összes variációs panelem varianciakomponens-elemzését mutatja a célzott RNS-variánsokkal.

67. táblázat A célzott RNS-variánsok alátámasztó leolvasásainak varianciakomponens-elemzése

Célzott variáns	N	Átlagos alátámasztó leolvasások	Vizsgálóhelyi SD (%CV)	Kezelő (vizsgálóhely) SD (%CV)	Nap (vizsgálóhely, kezelő) SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Futtatás SD (%CV)	Teljes 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 splice-variáns	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET 14-es exont kihagyó splice-variáns	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Laboratóriumon belüli precizitás

Két vizsgálatot végeztek a laboratóriumon belüli precizitás értékelésére a TSO Comprehensive (EU)-hoz. Az 1. vizsgálat az NTRK és RET fúziókat, valamint a RET kis DNS variációkat értékelte. A 2. vizsgálat a TMB-t és az MSI-t értékelte.

1. vizsgálat

A laboratóriumon belüli precizitást NTRK1–3 fúzió (alacsonyabb fokú glioma, Glioblastoma Multiforme, miofibroblasztos szarkóma, emlő szekréciós carcinoma), RET fúzió (pajzsmirigyrák és ismeretlen rákból származó bőrszövet) és RET kis DNS-variánsok (medulláris pajzsmirigyrák) esetében értékelték a jelzett rákok

FFPE-szövetével. Minden mintát két variánsszinten teszteltek: ~1x LoD (alacsony variánsszint) és ~2–3x LoD (magas variánsszint), kivéve a CCDC6-RET telítő mintát, amelyet csak alacsony variánsszinten teszteltek. Minden egyes tesztszinten mindegyik mintát két példányban futtatták minden könyvtár-előkészítési eseményben, három (3) kezelőn keresztül. Minden kezelő három (3) nem egymást követő napon kezdte el a könyvtár előkészítését, és három (3) kijelölt NextSeq 550Dx műszeren sorba rendezte őket. Három (3) reagenstételt teszteltek, amelyek szintenként 54 megfigyelést generáltak. Egyes szinteken kevesebb mint 54 megfigyelés történt az érvénytelen könyvtárak miatt.

Kvalitatív elemzés

A variánsok azonosításának kvalitatív egyezését külön értékelték egy adott variáns két variánsára vonatkozóan az összes változó (kezelők, reagenstételek, műszerek, napok és replikátumok) összesített megfigyeléseiből. A pozitív azonosítások százalékos arányát (PPC) és a negatív azonosítások százalékos arányát (PNC) és a kapcsolódó kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumot (Wilson-pontszám) [68. táblázat](#) (kis DNS variánsok) és a [69. táblázat](#) (RNS-fúziók) foglalja össze.

Magas variánsszinten (~2–3x LoD) a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat 100%-ot mutatott a PPC és PNC esetében, az összes vizsgált variánsnál.

Alacsony variánsszinten (~1x LoD) a kis DNS-variánsok PPC értéke 83,3% és 98,1% között, az RNS-fúziók PPC értéke pedig 90,7% és 100% között volt. A < 95%-os PPC-vel rendelkező variánsok esetében az átlagos VAF-ek (RET C634Y és RET D898_E901del) vagy az alátámasztó leolvasások (NCOA4-RET és BCAN-NTRK1) a vonatkozó kimutatási határértékek alatt voltak. Alacsony variánsszinten minden variáns esetében 100%-os PNC-t értek el.

68. táblázat Kvalitatív eredmények a célzott DNS-variánshoz

Variánsszint	Variáns	Variáns típusa	Átlagos VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3 – 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	DELÉCIÓ	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*	DELÉCIÓ	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Variánsszint	Variáns	Variáns típusa	Átlagos VAF	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	DELÉCIÓ	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*	DELÉCIÓ	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* A nukleotidváltozások az egyes variánsok esetében a Kimutatási határérték szakaszban vannak felsorolva, kivéve a RET D631_L633delinsE-t, amely a 10. kromoszóma, 43609940 pozíció, referencia ACGAGCT, alternatív A.

69. táblázat Kvalitatív eredmények a célzott RNS-fúziókhoz

Variáncsszint	Fúzió	Átlagos alátámasztó leolvasások	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE sejtvonal)	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 (1. minta)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (2. minta)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Variánsszint	Fúzió	Átlagos alátámasztó leolvasások	PPC (%) (n/N) (95% CI)	PNC (%) (n/N) (95% CI)
~2-3x LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE sejtvonal)	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	NA	Nincs tesztelve	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (1. minta)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (2. minta)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kvantitatív elemzés

Korlátozott maximális valószínűségű (REML) varianciakomponens-elemzést végeztek az alapul szolgáló folyamatos változó (VAF a kis DNS-variánsok és az alátámasztó leolvasások RNS-fúziók esetén) teljes variációjának értékelésére és a precíziós [szórás (SD), variációs koefficiens (CV)] összetevők becslésére minden egyes variációs forrásra [kezelők, műszerek, napok, reagenstételek, maradék és összes]. Az eredményeket a kis DNS-variánsok a [70. táblázat](#) és az RNS-fúziók a [71. táblázat](#) tartalmazza.

A VAF változása a binomiális arányra várt átlaggal növekedett. Az alátámasztó leolvasások eltérései a számlálási adatoknál várt átlaggal növekedtek. A maradék komponens volt a legnagyobb hozzájáruló a teljes varianciához mind a kis DNS-variánsok, mind az RNS-fúziók esetében mindkét szinten, ami azt a következtetést támasztja alá, hogy e variánsok TSO Comprehensive (EU) szerinti detektálása robusztus a kezelők, tételek, műszerek és napok számára.

70. táblázat Kvantitatív SD- és CV-eredmények a célzott kis DNS-variánsok esetében

VAF szint	Variáns	Variáns típusa	N Érvényes kísérletek	Átlagos VAF	Kezelő SD (%CV)	Műszer SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Nap SD (%CV)	Maradék SD (%CV)	Teljes SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELÉCIÓ	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	DELÉCIÓ	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	DELÉCIÓ	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	DELÉCIÓ	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)

71. táblázat Kvantitatív SD és CV eredmények a célzott RNS fúziók esetében

Leolvasási szint alátámasztása	Fúzió	N Érvényes kísérletek	Átlagos alátámasztó leolvasások	Kezelő SD (%CV)	Műszer SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Nap SD (%CV)	Maradék SD (%CV)	Teljes 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 (sejtvonal)	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 (1. minta)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (2. minta)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Leolvasási szint alátámasztása	Fúzió	N Érvényes kísérletek	Átlagos alátámasztó leolvasások	Kezelő SD (%CV)	Műszer SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Nap SD (%CV)	Maradék SD (%CV)	Teljes 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 (sejtvonal)	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 (1. minta)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (2. minta)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

2. vizsgálat

A laboratóriumon belüli precizitást a TMB és MSI szempontjából értékelték. Öt NSCLC FFPE DNS-mintát használtak a TMB-hez és hét CRC FFPE mintát az MSI-hez, beleértve mind a mikroszatellita stabil (MS-Stable), mind a magas MSI-értékű (MSI-High) mintákat, a pontosság különböző szinteken történő értékeléséhez a pontszámok tartományában. Mindegyik mintát két példányban futtatták három (3) kezelő segítségével, három (3) napon keresztül, három (3) könyvtári előkészítéssel, három (3) reagenstételhez, három NextSeq 550Dx műszer használatával, amelyek szintenként 54 megfigyelést generáltak.

Kvalitatív konkordanciát értékelték az MSI-státusz szempontjából. A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat 100%-os egyezést mutatott a pozitív és a negatív azonosítások százalékos arányára az MSI-státusz esetében. A TMB esetében a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat TMB-pontszámot jelent; kvalitatív konkordancia nem alkalmazható.

A TMB és MSI pontszámok teljes variációját, valamint a forrás szerinti hozzájárulást (műszerek, kezelők, tételek, napok és maradvány) egy varianciakomponens-modell segítségével számszerűsítették a pontszámok különböző tartományaiban. A standard deviációt (SD) és a variációs együtthatót (CV) a TMB esetében a [72. táblázat](#), az MSI esetében pedig a [73. táblázat](#) ismerteti szint szerint. Egyes szinteken kevesebb mint 54 megfigyelés történt az érvénytelen könyvtárak miatt.

72. táblázat Kvantitatív TMB-pontszám SD és CV eredmények

Szint	Átlagos TMB-pontszám	N Érvényes kísérletek	Kezelő SD (%CV)	Műszer SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Nap SD (%CV)	Maradék SD (%CV)	Teljes SD (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)

Szint	Átlagos TMB-pontszám	N Érvényes kísérletek	Kezelő SD (%CV)	Műszer SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Nap SD (%CV)	Maradék SD (%CV)	Teljes SD (%CV)
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)

73. táblázat Kvantitatív MSI pontszám SD és CV eredmények

MSI-státusz	Level (Szint)	Átlagos MSI pontszám (%)	N Érvényes kísérletek	Kezelői SD (%CV)	Műszer SD (%CV)	Tétel SD (%CV)	Nap SD (%CV)	Maradék SD (%CV)	Teljes SD (%CV)
MS-stabil	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-Magas	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)

A TMB-pontszámok eltérése általában az átlaggal nő, ahogy az a számadatok elméleti eloszlásától várható. Az MSI = 50 pontszámhoz közeli szintekre nagyobb, mint a 0-hoz közelebbi MSI pontszámok eltérése, vagy 100 az arányadatok elméleti eloszlásától való eltérésnek megfelelően. A maradék összetevő maradt a legnagyobb hozzájárulója mind az MSI, mind a TMB-pontszámok teljes varianciájának, ami azt a következtetést támasztja alá, hogy a pontszámok robusztusak a kezelők, tételek, műszerek és napok számára. Mivel azonban mind az MSI, mind a TMB összetett biomarkerek, és az analitikai teljesítmény mintánként változhat. Ez azt jelenti, hogy a TMB variáció nem csak a TMB értéktől függ, hanem a minta variánsainak összetételétől is, például a variáns típusától (SNV, Indel) és a VAF szinttől (a bevonási határértékhez való közelségtől). Hasonlóképpen, az MSI variáció nem csak az MSI értéktől függ, hanem a minta helyeinek összetételétől is, például az instabil helyek számától és a helyenkénti instabilitás mennyiségétől.

A 20,00%-os küszöbérték körüli C5 és C95 értékeket az MSI-re precíziós profil segítségével határozták meg (74. táblázat).

74. táblázat C5-C95 intervallumok MSI-hez

Pontszám	C5	C95
MSI	17,17%	23,32%

A tumortartalom TMB és MSI pontszámokra gyakorolt hatását értékelték. A legtöbb minta esetében a $\geq 30\%$ -os tumortartalom elhanyagolható hatással volt a megabázisonként körülbelül 10 mutáció feletti TMB-pontszámokra. A TMB-pontszámok viszonylag változatlanok maradtak a tumortartalom növekedésével. Az MSI-magas (MSI-High) minták esetében a tumortartalom pozitív, lineáris korrelációt mutatott az MSI-pontszámmal. Az MSI-magas (MSI-High) minták átlagosan MSI-magas (MSI-High) besorolásban maradtak, amikor a tumortartalom $\geq 30\%$ volt. Az endometriális minták a többi szövettípustól eltérően viselkedtek, és úgy találták, hogy nagyobb mennyiségű tumortartalomra van szükségük ahhoz, hogy MSI-magasként (MSI-High) azonosítsák őket.

Tumorprofilozás pontossága

A variánsok TSO Comprehensive (EU) vizsgálatonkénti kimutatását összehasonlították a referenciamódszerek eredményeivel. A DNS kis variánsait és a TMB-t egy külsőleg validált teljes exom NGS módszerrel hasonlították össze. A génamplifikációkat ugyanazzal a teljes exom NGS módszerrel vagy validált kettős in-situ hibridizációs (DISH) módszerrel hasonlították össze a HER2 amplifikációkhoz. Az MSI-t validált MSI-PCR teszttel összehasonlítva értékelték. Az RNS-splice-variánsokat validált kvantitatív PCR (qPCR) módszerrel hasonlították össze. A ROS1 és ALK fúziókat validált FISH vizsgálatokkal hasonlították össze. Minden más fúziót összehasonlítottak egy összetett módszerrel, amely egy validált RNS-teljes exom NGS vizsgálatból (RNGS1), egy célzott NGS-panelből (RNGS2) és egy csepp digitális PCR-ből (ddPCR) áll.

Kis DNS-variáns kimutatása

A kis DNS-variánsok TSO Comprehensive (EU) vizsgálat általi kimutatását összehasonlították a teljes exomszekvenálás (WES) eredményeivel, amely WES-t használ egyező tumor normál mintapárokkal csíravonal és szomatikus kis variáns azonosításához. Az egyetlen nukleotidvariánsból (SNV), inszerciókból és deléciókból álló kis variánsok közötti összehasonlítás 14 különböző szövettípusból származó 124 mintán alapult, amelyek mind a TSO Comprehensive (EU)-ra, mind pedig a WES-re is érvényesek voltak. A TSO Comprehensive (EU) képes volt, de WES vizsgálat nem, többnukleotidos variánst (MNV-k, 2 – 3 bp) kimutatni, amely szinronizálást igényel. TSO Comprehensive (EU) Az MNV-eket egyéni SNV-kként értékelték a WES-sel szemben. A variáns szintű konkordancia összefoglalása, beleértve a pozitív százalékos egyezést (PPA) és a negatív százalékos egyezést (NPA) az összes variáns azonosításra a [75. táblázat](#) található.

75. táblázat A csíravonal vagy szomatikus állapot szerint értékelt kis variánsú azonosítások konkordancia-összefoglalója

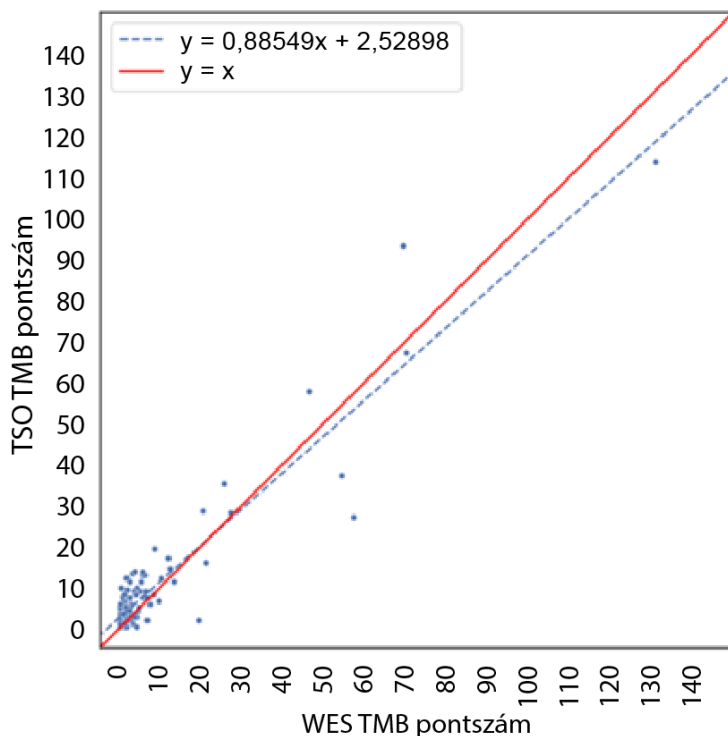
	WES szomatikus azonosítva	WES Germline azonosítva	WES nincs azonosítva
TSO Comprehensive (EU) azonosítva	382	33 163	426
TSO Comprehensive (EU) nincs azonosítva	69	61	70 000 481
Összes	451	33 224	70 000 907
Százalékos egyezés	PPA: 85% (382/451), 95% CI: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33 163/33 224) 95% CI: [99,8%, 99,9%]	NPA: > 99% (70 000 481/70 000 907) 95% CI: [99,999%, 99,999%]

Összesen 426 olyan variánst azonosított TSO Comprehensive (EU), amelyeket nem észleltek a WES módszerben. Ezen variánsok közül kétszáznegy (48%) variáns allélgyakorisága a WES módszer azonosításának küszöbértéke alatt volt. A fennmaradó potenciális álpozitív variánsok közül bizonyíték volt arra, hogy a WES módszer variánsazonosítása alacsony támogatással történt. Ezenkívül a variánsok közül soknak nagyon alacsony szintű WES bizonyítéka volt az egyező normál mintákban. Ez az eredmény arra utal, hogy ezeket a variánsokat a WES nem hagyta ki a tumorban a normál szennyezésű tumor miatt.

Tumormutációs terhelés kimutatása

A TMB-konkordanciát úgy határozták meg, hogy összehasonlították a TMB-pontszámokat (szomatikus mutációk/megabáz) a WES módszer és a TSO Comprehensive (EU) között, 124 minta esetében a rendelkezésre álló adatokkal együtt mind a TSO Comprehensive (EU), mind pedig a WES szerint. Lineáris regressziós elemzés WES-szel mint prediktorral 2,53-as y-intercepttel, 0,89-es meredekséggel és 0,94-es Pearson-féle korrelációs együtthatóval (3. ábra).

3. ábra TMB-pontszám korreláció a WES és a TSO Comprehensive (EU) között



Génamplifikáció észlelése

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálattal kimutatott génamplifikációkat összehasonlították ugyanazon WES-vizsgálat eredményeivel, amelyhez vagy tumor-normál illesztett mintákat, vagy csak tumoros mintákat használtak. Összesen 420 minta volt, közülük 183 az ortogonális tumor-normál módszert, 237 pedig a csak tumoros módszert használta. A 420 mintából 50 mintát választottak ki a vizsgálathoz, mert amplifikációs pozitívak voltak TSO Comprehensive (EU) vagy egy korábbi vizsgálattal. Ezeknek a jellemzett mintáknak a teljesítményét átlagos fúziós prevalenciával módosították. A jellemzett és nem jellemzett minták összesített teljesítményét fordított varianciával súlyozott átlaggal számolták ki. A minták 14 szövettípusból származnak, és 55 génből származó amplifikációkat tartalmaztak. A TSO Comprehensive (EU) MET és ERBB2 génekből származó génamplifikációkról számol be. A pontosságot azonban mind az 55 génre felmérték. A génamplifikációs azonosítások összefoglalását a 76. táblázat mutatja.

76. táblázat A génamplifikációk közötti egyezés összefoglalása

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

* A megbízhatósági intervallumot bootstrap módszerrel számították ki.

A gyomor- és emlőszövetek ERBB2 (HER2) amplifikációit a többi génamplifikációtól elkülönítve elemezték kettős in situ hibridizációs módszerrel (DISH). Összesen 116 emlő- és gyomormintát teszteltek, amelyek közül 64-et korábban IHC vagy FISH módszerrel HER2-pozitívnak minősítettek. Egy minta extrahálása sikertelen volt, 4 minta érvényessége sikertelen volt a(z) TSO Comprehensive (EU) esetében, és 3 minta érvényessége sikertelen volt a DISH vizsgálat esetében. A 108 minta közül 20 (18,5%) kapott határérték pontszámot (1,5 és 2,5 között) a DISH 2,0-s határértéke közelében. A konkordanciaeredményeket, beleértve a PPA-t, NPA-t az összes mintára vonatkozóan, kivéve a határértékes HER2 DISH eseteket, a [77. táblázat](#) mutatja.

77. táblázat A TSO átfogó és a HER2 DISH közötti konkordancia összefoglalása, beleértve a HER2 génamplifikációt is

HER2 Génamplifikáció Összes (emlő és gyomor)	HER2 DISH amplifikált	HER2 DISH nem amplifikált
TSO Comprehensive (EU) Pozitív	17 (1 határértékkel együtt)	13 (1 határértékkel együtt)
TSO Comprehensive (EU) Negatív	10 (6 határértékkel együtt)	68 (beleértve a 12 határértéket)
Százalékos egyezés, beleértve a határeseteket	PPA: 63% (17/27) 95% CI: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95% CI: [74%, 90%]
Százalékos egyezés, kivéve a határeseteket	PPA: 80% (16/20) 95% CI: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95% CI: [72%, 90%]

Mikroszatellita-instabilitás észlelése

A mikroszatellita-instabilitás kimutatását a TSO Comprehensive (EU) vizsgálatnál egy validált MSI-PCR teszt eredményeivel hasonlították össze, amely a tumorhoz normálisan illeszkedő mintákat használ a teszteléshez. Összesen 195 mintát hasonlítottak össze, amelyek megfelelnek a $\geq 30\%$ -os tumortartalom követelménynek (MS-stabil státusz) és 14 szövettípust képviselnek. Az MSI-PCR 5 helyet értékel, és 3 kimenettel rendelkezik — MSI stabil (nincs instabil hely), MSI-alacsony (egy instabil hely) és MSI-magas (MSI-H) (két vagy több instabil hely). A(z) TSO Comprehensive (EU) legfeljebb 130 mikroszatellitahelyet értékel, és csak MS-stabil vagy MSI-magas ($\geq 20\%$ instabil hely) kategóriába sorolja a mintákat. Az MSI-alacsony kategóriát az MSI-PCR MS-stabil kimenetelével csoportosították. A konkordanciaelemzést a [78. táblázat](#) mutatja.

78. táblázat A DNS mikroszatellita-instabilitásra vonatkozó konkordanciaelemzés összefoglalása a TSO Comprehensive (EU) és az MSI-PCR között

MSI-státusz	PCR MSI-magas	PCR MSI-alacsony	PCR MSI-stabil
TSO Comprehensive (EU) Instabil (MSI--magas)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabil (MS-stabil)	3	0	150
Összes	44	2	150
Százalékos egyezés	PPA: 93% (41/44) 95% CI: [82%, 98%]	NPA: 99% (150/152) 95% CI: [95%, > 99%]	

RNS-splice-variáns kimutatása

A splice-variáns kimutatásának pontossága a TSO Comprehensive (EU) eredmények, valamint az EGFRvIII és a Met Exon átugrás 14 vizsgálatának összehasonlításával lett kiszámítva, beleértve egy ismert pozitív RNS-t minden egyes splice-variánsra. A konkordanciaelemzést összesen 230 egyedi FFPE RNS-mintán végezték 14 szövettípusból, a rendelkezésre álló adatokkal mind a TSO Comprehensive (EU), mind pedig a referenciamódszerrel. Minden mintát MET Exon14 átugrásra, míg az EGFRvIII-at csak agyszövetre tesztelték. A MET exon14 átugrásra a qPCR-rel pozitívnak, de az TSO Comprehensive (EU) teszttel nem annak azonosított három minta átlagos Ct-je >37 volt, és az TSO Comprehensive (EU) LoD szint alatt volt. A [79. táblázat](#) összefoglalja a konkordanciavizsgálat eredményeit.

79. táblázat Az RNS-splice-variánsok konkordanciaelemzésének összefoglalása a(z) TSO Comprehensive (EU) és a qPCR-vizsgálat között

RNS-splice-variánsok	qPCR pozitív	qPCR negatív
TSO Comprehensive (EU) Pozitív (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negatív (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) Pozitív (MET 14. exon átugrása)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Negatív (MET 14. exon átugrása)	3	217
Összes	7	230
Százalékos egyezés	PPA: 57% (4/7) 95% CI: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95% CI: [98%, 100%]

RNS-fúzió kimutatása

Összehasonlítás összetett módszerrel

TSO Comprehensive (EU) fúziókat hasonlítottak össze egy összetett módszerrel, amely egy NGS panel (RNGS1), egy célzott NGS fúziós panel (RNGS2) és egy csepp digitális PCR (ddPCR) segítségével végzett RNS teljes exom szekvenálásból áll.

Az RNGS1 módszer átfedésben van az összes olyan génnel, TSO Comprehensive (EU) amelyek esetében kimutathat fúziókat. Az RNGS1 módszer kimutatási határértéke azonban 4–8-szorosa volt a(z) TSO Comprehensive (EU) összehasonlításában, az átfedő fúziós azonosítások során megfigyelt alátámasztó leolvasások száma alapján. Ezért a WES (RNGS1) módszerrel két további, a fúziókkal szemben nagyobb érzékenységgű, de kevésbé átfogó kompozit módszert használtak.

Összesen 255 egyedi RNS-mintát teszteltek 14 szövettípussal és megfelelő TSO Comprehensive (EU) mérőszámot teszteltek az RNGS1 segítségével. Két minta érvénytelen volt az RNGS1 minta minőségellenőrzéséhez, és kizárták őket a további elemzésből. Az TSO Comprehensive (EU) által azonosított 82 fúzióból 4-et kizártak az értékelésből RNGS1 minta minőségellenőrzési hibája miatt, és 7 további fúziót nem azonosítottak az RNGS1 panelben lévő célok hiánya miatt. A(z) TSO Comprehensive (EU) által azonosított fennmaradó 71 fúzióból 9 fúziót igazolt az RNGS1. Az RNGS1 4 fúziót azonosított, amelyet a TSO Comprehensive (EU) nem azonosított.

A 62 TSO Comprehensive (EU) pozitív és az RNGS1 által nem detektált fúzió közül 13 átfedésben volt az RNGS2-vel, amely azokat megerősítette. Az egyik fúziót az RNGS2 azonosította, de a TSO Comprehensive (EU) nem azonosította.

Ezután csepp digitális PCR-t használtak a TSO Comprehensive (EU) által azonosított fúziókhoz, amelyeket nem azonosított az RNGS1 vagy általa nem volt azonosítható, és amelyek az RNGS2 számára nem voltak értékelhetők (49). Ezenkívül ddPCR-t alkalmaztak a 4 álnegatív fúzióból 2 újraértékelésére TSO Comprehensive (EU) esetén RNGS1-gyel, és 9 egyező fúzióból 2 újraértékelésére TSO Comprehensive (EU) és RNGS1 esetén. Öt fúziós negatív mintát vontak be minden pozitív fúziós minta tesztelésébe a specifikusság biztosítása érdekében. Tizennyolc fúziót nem teszteltek ddPCR-rel, mert nem tudtak primereket/szondákat, több génpartnert tervezni a fúzióhoz, vagy nem volt elegendő megmaradt FFPE-anyag. A ddPCR esetén a primereket és próbákat a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat megfigyelt töréspontjaihoz képest tervezték.

Összesen 52 fúziót mutattak ki ddPCR-rel, közülük 41 fúziót azonosított a(z) TSO Comprehensive (EU), de az RNGS1 nem azonosította vagy nem volt általa azonosítható. Kilenc fúziót ddPCR-rel azonosítottak, de TSO Comprehensive (EU) vagy RNGS1 esetén negatívak voltak. Két ddPCR pozitív fúzió igazolta a 2 egyező fúziót TSO Comprehensive (EU) és RNGS1 esetén. A ddPCR nem mutatott ki fúziót az RNGS1 segítségével a 2 újraértékelte TSO Comprehensive (EU) álnegatív esetében, ezeket azonban az RNGS1 összehasonlítás alapján álnegatívnak tekintették.

A 255 mintából 35 mintát választottak ki a vizsgálathoz, mert amplifikációs pozitívak voltak TSO Comprehensive (EU) vagy egy korábbi vizsgálattal. Ezeknek a jellemzett mintáknak a teljesítményét átlagos

fúziós prevalenciával módosították. A jellemzett és nem jellemzett minták összesített teljesítményét fordított varianciával súlyozott átlaggal számolták ki. Az összetett konkordanciaeredmény módszereket a fúzióknál a [80. táblázat](#) mutatja.

A kompozit módszerrel egyező 66 fúzió (54 egyedi fúzió) 43 gént képviselt a TSO Comprehensive (EU) panelen. Azonban a fúziók kizárólag a [80. táblázat](#) megadott 23 génről jelenthetők.

80. táblázat RNS-fúziók konkordancia-összefoglalója

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

* A megbízhatósági intervallumot bootstrap módszerrel számították ki.

Összehasonlítás a FISH módszerrel a ROS1 és ALK fúziók esetében

Huszonöt NSCLC mintát vizsgáltak FISH módszerrel mind a ROS1, mind az ALK fúziók tekintetében, és 5 további NSCLC mintát vizsgáltak ROS1 fúziókra. Nyolc minta nem felelt meg a FISH-nek a ROS1-nél nem megfelelő szövet miatt. Mind a(z) TSO Comprehensive (EU), mind a FISH két ROS1 és egy ALK fúziót észlelt. Nem figyeltek meg eltérő eredményeket. A [81. táblázat](#) összefoglalja a ROS1 TSO Comprehensive (EU) és ALK fúziók konkordanciaeredményeit és a FISH módszert.

81. táblázat A ROS1 és ALK fúziók TSO Comprehensive (EU) és FISH módszer konkordanciaeredményeinek összefoglalása

ALK+ROS1	FISH pozitív	FISH negatív
TSO Comprehensive (EU) Pozitív	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negatív	0	44
Összes	3	44
Százalékos egyezés	PPA: 100% (3/3) 95% CI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95% CI: [92%, 100%]

Minta érvényessége

A minta érvényességét (első próbálkozás) 181 egyedi RNS- és 272 egyedi DNS-minta esetében mérték a ≤ 5 éves FFPE-blokkokból. Ezeket a mintákat a szövet típusa és a rendelkezésre álló anyag alapján választották ki; a vizsgálat érvényessége ismeretlen volt. A könyvtár minőségellenőrzési mérőszámainak meg kell felelniük ahhoz, hogy a variáns típusa érvényesnek minősüljön. A minták érvényességét külön értékelték az egyes variánstípusokra (kis DNS-variánsok/TMB, MSI, génamplifikációk, fúziók/splice-variánsok) vonatkozóan, és az [82. táblázat](#) mutatja be. A ≤ 2 éves FFPE-blokkok esetén az MSI érvényességének további 1%-os csökkenése várható a reagens szállítása miatt.

82. táblázat Minta érvényessége

Variáns típusa	Minta érvényessége
Fúziók/splice- variánsok (RNS)	76%
Kis DNS-variánsok/TMB	75%
MSI	72%
Gén amplifikáció	94%

A tumorprofilozási igények analitikai validálásának összefoglalása

A kimutatási határ, a precizitás, a reprodukálhatóság és a pontossági adatok alapján TSO Comprehensive (EU) analitikailag validált az alábbiakhoz:

- A kisméretű DNS-variánsok—SNV-k, MNV-k, inszerciók és deléciók.
- TMB
- MSI
- MET és ERBB2 (HER2) génamplifikációk (lásd [2. táblázat](#)).
- 23 gén, amelyek esetében fúziók mutathatók ki (lásd [2. táblázat](#)).
- EGFR és MET splice-variánsok (lásd [2. táblázat](#)).

NTRK klinikai teljesítmény

A VITRAKVI (larotrectinib) kezelés betegeinek kiválasztására szolgáló társdiagnosztikai (CDx) TSO Comprehensive (EU) vizsgálat validálása érdekében a larotrectinib klinikai vizsgálatokba bevont betegek mintáit (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; a továbbiakban együttesen larotrectinib vizsgálati minták) tesztelték egy 2019. július 15-i adatszárás felhasználásával, kereskedelmi forrásból származó FFPE-szövetmintákkal kiegészítve, a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat pontossági vizsgálata és a klinikai áthidalási vizsgálat alátámasztásának érdekében.

Az NCT02122913 egy multicentrikus, nyílt elrendezésű, I. fázisú dóziseszkalációs vizsgálat volt előrehaladott szolid tumorban szenvedő felnőtt betegeknél (minden jelentkezőnél), akiket nem választottak ki az NTRK fúziópozitív rák csoportba. A vizsgálat dóziseszkalációs részét követően dóziskiterjesztést indítottak dokumentált NTRK fúziópozitív rákban szenvedő betegeknél, és azoknál a betegeknél, akikről a vizsgáló úgy vélte, hogy egy erősen szelektív TRK inhibitor előnyös lehet számukra. A NAVIGATE NCT02576431 egy folyamatban lévő, multicentrikus, nyílt, II. fázisú, kosárvizsgálat 12 éves és idősebb, kiújuló előrehaladott szolid tumorokban szenvedő, dokumentált NTRK fúzióval rendelkező betegeknél, külső laboratórium értékelése szerint. A SCOUT NCT02637687 egy folyamatban lévő, multicentrikus, nyílt elrendezésű, I/II. fázisú vizsgálat előrehaladott szolid vagy primer központi idegrendszeri (CNS) tumorban szenvedő, születéstől 21 éves korig terjedő gyermekgyógyászati betegeknél.

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálatba bevont NTRK fúziópozitív betegek közül 164 alkotta a larotrectinib kiterjesztett elsődleges hatásossági halmazt (ePAS4).

Pontossági vizsgálat az NTRK1, NTRK2, NTRK3 fúzió detektáláshoz

Az NTRK fúziók (NTRK1, NTRK2 vagy NTRK3) kimutatására szolgáló TSO Comprehensive (EU) vizsgálat pontosságát szolid tumorban szenvedő betegeknél az NTRK fúziós eredmények NGS alapján TSO Comprehensive (EU) történő egyezésének értékelésével igazolták.

Retrospektív, beavatkozással nem járó vizsgálatot végeztek. A larotrectinib vizsgálati mintákat és kiegészítő mintákat a TSO Comprehensive (EU) vizsgálatnál egy külső vizsgálóhelyen, ortogonális módszerrel központi laboratóriumban tesztelték. A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat NTRK fúziós azonosításainak pontosságát az ortogonális módszerhez viszonyítva becsülték meg; a pozitív százalékos egyezést (PPA), a negatív százalékos egyezést (NPA) és a kapcsolódó kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumokat (CI) számították ki.

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálatnál és/vagy az ortogonális módszerrel 516 mintát teszteltek. Ezen minták közül 499-et vizsgáltak mindkét módszerrel. Az 516 minta közül tizenhetet nem teszteltek az egyik vizsgálatnál sikertelen extrakció, ismeretlen ok (az ortogonális módszerhez) vagy a protokolltól való eltérés miatt. A mindkét módszerrel tesztelt 499 minta közül 170 (34,1%) volt larotrectinib vizsgálati minta és 329 (65,9%) volt kiegészítő minta.

A 499 minta eredményeinek kereszt-táblázatos összefoglalóját a [83. táblázat](#) mutatja be. A 499 mintából 85 minta TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredményei érvénytelenek voltak; ebből 85, 53 esetben a módszer ortogonális eredményei is érvénytelenek voltak. További hét mintának érvénytelen ortogonális módszer eredményei voltak. Így a 499 mintából 407-nek volt érvényes eredménye mindkét módszerrel.

83. táblázat NTRK pontossági vizsgálat: A TSO Comprehensive (EU) eredmények és az ortogonális módszer eredményeinek kereszt-táblázata az NTRK fúzió kimutatásához

TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredmény	NTRK fúzió pozitív	Ortogonális módszer eredménye		
		NTRK fúzió negatív	Érvénytelen	Összes
NTRK fúzió pozitív	114	16	1	131
NTRK fúzió negatív	4	273	6	283
Érvénytelenek*	4	28	53	85
Összes	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) a vizsgálat érvénytelen eredményei a mintából és a futtatási szintből származnak.

Az egyezési elemzéseket, az érvénytelen TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredmények kizárásával és belefoglalásával, a [84. táblázat](#) mutatja be. Az érvénytelen TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredmények kivételével a PPA 96,6% (114/118; 95% CI: 91,5% – 99,1%) és az NPA 94,5% (273/289; 95% CI: 91,2% – 96,8%) volt.

84. táblázat NTRK pontossági vizsgálat: A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat PPA-ja és NPA-ja az NTRK fúziók kimutatásához használt ortogonális módszer eredményével összehasonlítva

Egyezés mértéke	Érvénytelen TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredmények kizárása		Érvénytelen TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredményekkel együtt	
	Egyezés, % (n/N)	95% CI*	Egyezés, % (n/N)	95% CI*
PPA	96,6 (114/118)	91,5, 99,1	93,4 (114/122)	87,5, 97,1
NPA	94,5 (273/289)	91,2, 96,8	86,1 (273/317)	81,8, 89,7

*95%-os CI (pontos) Clopper-Pearson féle módszer alapján.

Klinikai áthidaló vizsgálat az NTRK1, NTRK2, NTRK3 fúzió detektáláshoz

Egy klinikai áthidaló vizsgálatban igazolták az NTRK1, NTRK2 vagy NTRK3 fúziók kimutatására szolgáló TSO Comprehensive (EU) vizsgálat klinikai érvényességét olyan szolid tumorban szenvedő betegeknél, akiknek előnye származhat a larotrectinib kezelésemből. A vizsgálatot azért végezték, hogy felmérjék a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat klinikai hatásosságát az NTRK1, NTRK2 vagy NTRK3 fúziópozitív betegek azonosítására a larotrectinibbel történő kezelés során, valamint hogy értékeljék a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat és a helyi vizsgálati (LT) módszerek közötti egyezést (az NTRK fúziós státusz meghatározására használják a larotrectinib klinikai vizsgálataiban).

Az LT módszerek közé tartoztak az NGS, a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH), a polimeráz láncreakció (PCR) és a NanoString vizsgálatok. Az NTRK fúziókat (ETV6 NTRK3) olyan csecsemőkori fibroszarkómában szenvedő betegeknél bizonyították, akiknél dokumentált FISH-val azonosított ETV6 transzlokációt állapítottak meg. A 235 ismert NTRK fúziós státuszú larotrectinib klinikai vizsgálati beteg legtöbbjét NGS módszerekkel vizsgálták.

A 2019. július 15-ig kapott adatok szerint 279 beteget vontak be. A 279 beteg közül 208 volt NTRK fúziópozitív. A 208 pozitív betegből 164 alkotta a larotrectinib ePAS4-et.

A larotrectinib hatásossági elemzésének elsődleges végpontja a független felülvizsgáló bizottság (IRC) értékelése szerinti teljes válaszarány (ORR) volt a három klinikai vizsgálatból származó összevont adathalmazban. Az ORR-t azon betegek aránya alapján értékelték, akiknél a RECIST 1.1-es verziója szerinti kritériumok alapján a legjobb teljes válasz vagy megerősített részleges válasz áll fenn. Az ORR a larotrectinib ePAS4-ben 72,6% volt (95% CI [65,1%, 79,2%]), és 16 különböző tumortípussal rendelkező betegeket vontak be.

Minta elszámolása

A mintakészlet a tumortípusok széles skáláját, valamint gyermek és felnőtt betegmintákat tartalmazott.

2019. július 15-ig 279 beteget vontak be a larotrectinib vizsgálatokba. Közülük 235 betegnél ismert volt az LT módszerrel meghatározott NTRK fúziós státusz: 208 volt pozitív és 27 volt negatív. 44 beteg esetében az NTRK fúziós státusz nem volt ismert, mivel a betegek alkalmasságához nem volt szükség vizsgálatra az NCT02122913 és SCOUT NCT02637687 vizsgálatok dóziseszkalációs fázisaiban. A TSO Comprehensive (EU)

vizsgálat klinikai áthidalási vizsgálatában a larotrectinib vizsgálatban 2019. július 15-én bevont, ismert NTRK fúziós státuszú betegektől származó minták (208 pozitív és 27 negatív beteg) és a reprezentatív LT módszerekkel NTRK fúzió negatívnak ítélt kiegészítő minták voltak alkalmasak erre a vizsgálatra.

A 208 pozitív larotrectinib vizsgálati mintából 154-nek volt elérhető mintája TSO Comprehensive (EU) a vizsgálat teszteléséhez. Ezek közül 138 érvényes eredménnyel rendelkezett. Tizenöt minta érvénytelen volt a sikertelen mintaszekvenálási minőségi mutatók miatt, és 1 mintát nem vizsgáltak a protokolltól való eltérés miatt. A 27 negatív larotrectinib vizsgálati mintából 24-nek volt elérhető mintája a teszteléséhez. Ezek közül 22 érvényes TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredménnyel rendelkezett. Két minta érvénytelen volt a sikertelen mintaszekvenálási minőségi mutatók miatt.

A kiegészítő mintákat két reprezentatív LT módszer egyikével szűrték. Több mint 350 mintát gyűjtöttek be és vizsgáltak meg a tumortartalom szempontjából. A mintakövetelményeknek megfelelő kiegészítő minták közül 266-ot sikerült kinyerni, és egy reprezentatív LT módszerrel megerősítették, hogy az NTRK fúzió negatív. Ezek közül a minták közül 260 volt elérhető TSO Comprehensive (EU) a vizsgálat teszteléséhez, amelyek közül 222-nek volt érvényes eredménye. 38 minta volt, amelyek a minta szekvenálási mutatóinak sikertelensége (n = 25) vagy a futtatás szekvenálásának sikertelensége (n = 13) miatt érvénytelenek voltak. A teljes NTRK fúziós negatív készlet 222 kiegészítő mintából és 22 larotrectinib vizsgálati mintából állt.

Konkordancia eredmények

Összesen 437 mintát vizsgáltak a(z) TSO Comprehensive (EU) segítségével. A 208 NTRK fúziós pozitív beteg közül 153-nak voltak elérhető mintái, amelyeket a(z) TSO Comprehensive (EU) segítségével vizsgáltak, ami 138 érvényes eredményt és 15 érvénytelen eredményt eredményezett.

Az LT módszerek eredményeihez viszonyított TSO Comprehensive (EU) eredmények egyezését érvénytelen TSO Comprehensive (EU) eredményekkel és anélkül a [85. táblázat](#) mutatja be.

85. táblázat NTRK klinikai áthidaló vizsgálat: Konkordancia a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat és az LT módszerek között az NTRK fúziók kimutatásához

Egyezés mértéke	A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat érvénytelen eredményeinek kizárása		A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat érvénytelen eredményeivel együtt	
	%-os egyezés (n/N)	95% CI*	%-os egyezés (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%

* A kétoldalas 95%-os CI-ket a (pontos) Clopper-Pearson féle módszerrel számították ki.

A hiányzó TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredményekkel szembeni érzékenységi elemzés az egyezési elemzés robusztusságát mutatta ki. Az LT NTRK fúziópozitív betegek hiányzó TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredményeit (n = 70) logisztikai regressziós modellel imputálták. Az egyezési becsléseket, beleértve az imputált értékeket is, a [86. táblázat](#) mutatja be.

86. táblázat NTRK klinikai áthidaló vizsgálat: Konkordancia a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat és az LT módszerek között az NTRK fúziók kimutatásához, beleértve a hiányzó TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredményekkel rendelkező LT pozitív betegek imputált értékeit

Egyezés mértéke	Százalékos egyezés	95% CI*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Az LT fúziónegatív betegek hiányzó TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredményei nem kerültek imputálásra.

* A kétoldalas 95%-os CI-eket a többszörös imputációs Boot-módszer alapján számították ki. A többszörös imputációs Boot-módszer a többszörös imputációba beágyazott bootstrap lépés (Schomaker és Heumann 2018).

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálat és az LT-k közötti egyezéseket a módszer típusa szerint (például RNS-NGS, FISH) a 87. táblázat mutatja.

87. táblázat NTRK klinikai áthidaló vizsgálat: Konkordancia a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat és az LT módszerek között az NTRK fúziók kimutatásához LT módszertípus szerint

LT módszer típusa	Az egyezés mértéke	%-os egyezés (n/N)	95% CI ¹
DNS 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)
RNS 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	Nincs kiszámítva (1/1)	Nincs kiszámítva
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Nincs kiszámítva (0/0)	Nincs kiszámítva
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Nincs kiszámítva: a < 5 mintaszámú alcsoportok esetében nem számítottak ki egyezési statisztikákat.

¹ A kétoldalas 95%-os CI-eket a (pontos) Clopper-Pearson féle módszerrel számították ki.

² Ide tartoznak azok az NGS módszerek, amelyek csak RNS-t, valamint DNS-t és RNS-t is használnak.

A TSO Comprehensive (EU) vizsgálatot tesztelt 437 minta közül 24 kapott eltérő eredményeket az LT-kkel: 15 volt pozitív az LT-kkel és negatív a TSO Comprehensive (EU) vizsgálatot, és 9 volt negatív az LT-kkel és pozitív a TSO Comprehensive (EU) vizsgálatot. A 24, eltérő eredményű mintából 8-at vizsgáltak DNS NGS LT módszerrel, 14-et RNS NGS LT módszerrel és 2-t FISH módszerrel.

Egy validált, független NGS módszer megerősítette a TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredményeket a 24 mintából 14 esetében eltérő eredményekkel. A fennmaradó 10 minta esetében a TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredmények eltérők voltak mind az LT, mind a független NGS módszerrel.

Klinikai hatásossági eredmények

Az ePAS4 kohorszban belül a larotrectinib hatásossága a TSO Comprehensive (EU) pozitív, LT pozitív populációban (97 beteg, ORR=78,4%, 95% CI [68,8%, 86,1%]) hasonló volt a larotrectinib hatásosságához a teljes ePAS4 populációban (164 beteg, ORR=72,6%, 95% CI [65,1%, 79,2%]) (88. táblázat). Az ePAS4-ben a 97 TSO Comprehensive (EU) pozitív beteg közül 28 (28,9%) beteg ért el teljes választ/műtéti teljes választ, és 48 (49,5%) beteg ért el részleges választ.

A 13 TSO Comprehensive (EU) negatív, LT pozitív populációból 1 (7,7%) mutatott teljes választ, 2 (15,4%) pedig részleges választ larotrectinib terápiával.

88. táblázat NTRK klinikai áthidaló vizsgálat: ORR az LT pozitív betegek esetében LT szerint és TSO Comprehensive (EU) eredmények az ePAS4-ben

		LT fúzió pozitív N=164	TSO Comprehensive (EU) Pozitív és LT pozitív N=97	TSO Comprehensive (EU) Negatív és LT pozitív N=13
Legjobb teljes válasz, n (%)	Teljes válasz	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Sebészeti teljes válasz	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Részleges válasz	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabil betegség	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progresszív betegség	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Nem értékelhető	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Teljes válaszarány	Betegek száma, n	164	97	13
	CR + sCR + PR-ben szenvedő betegek száma, n	119	76	3
	ORR% (95% CI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Rövidítések: CR = Teljes válasz, PR = Részleges válasz, sCR = Sebészeti teljes válasz.

* A kétoldalas 95%-os konfidencia-intervallumot (pontos) Clopper-Pearson féle módszerrel számították ki.

54 betegnél hiányoznak a TSO Comprehensive (EU) vizsgálati eredmények.

A vizsgálatból származó adatok alátámasztják a TSO Comprehensive (EU) vizsgálat biztonságosságát és hatásosságát, amikor olyan NTRK fúziós szolid tumorban szenvedő betegek azonosítására használják, akik alkalmasak lehetnek a larotrectinibbel történő kezelésre.

Hivatkozások

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Hozzáférés: 2016. október 3.
2. Európai Orvosi Onkológiai Társaság. www.esmo.org. Hozzáférés: 2016. október 3.

Módosítási előzmények

Verzió	Dátum	Módosítások leírása
Dokumentumszám: 200007789 v08	Május 2025	<p>A szoftververziókra és alkatrészszámokra való hivatkozás eltávolítása.</p> <p>Az eljárás korlátainak frissítése:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nekrotikus szöveti információk. • MSI tumortartalom információ. <p>Frissítés:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Az NTC lábjegyzet a min. és max. könyvtárakra egyaránt vonatkozik. • A felszerelések és az anyagok felsorolják a lemezcentrifuga specifikációit és a pipetta léptékeket. • SPB többlétszámítás 1,05x-től 1,15x-ig. • A MET 14-es exon del terminológia MET 14-es exon átugrásra változtatása. <p>Hozzáadva:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Megjegyzés az KKV-k számára az 1. és 2. cél rögzítése funkcióban. • Készüljön fel a szekvenálás bevezetésére. • Az ultrahangkészülékre vonatkozó további információk. <p>Pontosítások hozzáadása és a teljesítményjellemzők frissített eredményei:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zavaró anyagok. • Pontosság a tumorprofilozáshoz és a minta érvényességéhez. • 1. és 2. kimutatási határérték vizsgálat. • 1. laboratóriumon belüli precizitás vizsgálat • 2. reprodukálhatósági vizsgálat • Könyvtárstabilitási és könyvtártárolási információk. • Vak határérték. <p>Frissített nyelvezet és nyelvtan.</p>

Verzió	Dátum	Módosítások leírása
Dokumentumszám: 200007789 v07	január 2024	<ul style="list-style-type: none"> • Információ lett hozzáadva az Eljárás korlátaihoz: <ul style="list-style-type: none"> • Nekrotikus szövet- és tumortartalom mintakövetelmények az MSI magas és szomatikus meghajtó mutációihoz. • A hemoglobin által okozott potenciális interferencia. • A RET-gén és a fúziós azonosítás észlelési határértékei az annotált génhatárokon kívül. • A géndelációk nem kerülnek jelentésre. • Frissítve a TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager szoftver 2.3.7 verziójával való használatra. • Információ lett hozzáadva a szükséges, de nem szállított berendezésekhez és anyagokhoz, beleértve két további ultrasonikátor konfigurációt. • Frissített minta- és mintaadatok: <ul style="list-style-type: none"> • Nekrotikus szövettartalom. • A proteináz K és a hemoglobin hatásai. • A tárgylemezre helyezett FFPE és tisztított nukleinsav tárolása. • Információ lett hozzáadva a reagenskezelés, a munkafolyamat és a futtatási minőség-ellenőrzési hibák hibaelhárításának javítására. • A teljesítményjellemzők kontextusa és egyértelműsége hozzá lett adva: <ul style="list-style-type: none"> • Keresztszennyeződés • Nukleinsav-extrakciós készlet értékelése • Zavaró anyagok • Nukleinsav és tárgylemezre szerelt FFPE stabilitás • NTRK klinikai teljesítmény • Frissített nyelvezet és nyelvtan
Dokumentumszám: 200007789 v06	február 2023	<ul style="list-style-type: none"> • További nyilatkozatok a Korlátozások részben • Nyelvi frissítések a konvencióhoz, nyelvtanhoz és érthetőséghez • A 21., 28., 29., 32., 35., 36., 72. táblázat javítása • Nyilatkozat a csapadékok jelenlétéről az FSM reagensben • Frissített hőciklus-szabályozó és csatornaspecifikációk a Berendezések és anyagok listában
Dokumentumszám: 200007789 v05	2022. szeptember	Frissítve a 2. vizsgálat reprodukálhatósági táblázatai

Verzió	Dátum	Módosítások leírása
Dokumentumszám: 200007789 v04	június 2022	<ul style="list-style-type: none"> Hozzáadott TSO Comprehensive elemzési modul v2.3.5 PN-ek Eltávolított TSO Comprehensive elemzési modul v2.3.3 PN-ek Frissített terminológia az Üres mérési határ részben
Dokumentumszám: 200007789 v03	április 2022	<ul style="list-style-type: none"> Az NTRK fúziókra vonatkozó teljesítményjellemzők hozzáadása CSAK EXPORTÁLÁSRA szolgáló jelölés hozzáadva. Frissített rendeltetésszerű használatra vonatkozó nyilatkozat az NTRK1-3 CDx igény hozzáadásához Bővített termékösszetevő-információk a szoftverösszetevők PN-jeihez
Dokumentumszám: 200007789 v02	február 2022	<ul style="list-style-type: none"> Javított táblareferencia hiba A csírvonalra és szomatikus variánsokra vonatkozó korlátozás hozzáadása Tisztázott nyelvezet a génamplifikáció kimutatása körül
Dokumentumszám: 200007789 v01	2021. december	<ul style="list-style-type: none"> Az eljárás frissített korlátozásai A mágneses állvány és a hőciklus-szabályozó műszaki jellemzőinek pontosítása a berendezések és az anyagok listájában
Dokumentumszám: 200007789 v00	november 2021	Első kiadás

Szabadalmak és védjegyek

A jelen dokumentum és annak tartalma az Illumina, Inc. és annak leányvállalatai („Illumina”) tulajdonát képezi, és kizárólag a jelen dokumentumban ismertetett termék(ek) szerződésszerű működtetéséhez használható. Egyéb célokra nem használható. A dokumentum és annak tartalma az Illumina előzetes írásos engedélye nélkül ettől eltérő célokra nem használható és forgalmazható, továbbá semmilyen formában nem kommunikálható, hozható nyilvánosságra vagy reprodukálható. Az Illumina a jelen dokumentummal nem biztosít licencet a termék vásárlójának a harmadik felek szabadalmi, védjegyjogi, szerzői jogi, szokásjogi vagy egyéb oltalom alatt álló jogosultságaihoz.

A jelen dokumentumban szereplő utasításokat a kvalifikált és megfelelően képzett személyzetnek szigorúan be kell tartania az itt ismertetett termék(ek) megfelelő és biztonságos használata érdekében. A termék(ek) használata előtt a felhasználó köteles átolvasni és értelmezni a jelen dokumentumban leírtakat.

AZ ITT SZEREPLŐ INFORMÁCIÓK ELOLVASÁSÁNAK VAGY AZ UTASÍTÁSOK BETARTÁSÁNAK ELMULASZTÁSA ESETÉN A TERMÉK(EK) MEGSÉRÜLHETNEK, ILLETVE SZEMÉLYI SÉRÜLÉS KÖVETKEZHET BE, IDEÉRTVE A FELHASZNÁLÓKAT ÉS MÁSOKAT IS, ILLETVE EGYÉB ANYAGI KÁROK KÖVETKEZHETNEK BE. EZENFELÜL ILYEN ESETEKBEN A TERMÉK(EK)RE VONATKOZÓ GARANCIA ÉRVÉNYÉT VESZTI.

AZ ILLUMINA SEMMIFÉLE FELELŐSSÉGET NEM VÁLLAL AZ ITT BEMUTATOTT TERMÉK(EK) HELYTELEN HASZNÁLATÁBÓL FAKADÓ KÁROKÉRT (AZ ALKATRÉSZEKET ÉS A SZOFTVERT IS IDEÉRTVE).

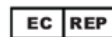
© 2025 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

Minden védjegy az Illumina, Inc., illetve az adott jogtulajdonosok tulajdonát képezi. A védjegyekkel kapcsolatos információkat lásd a www.illumina.com/company/legal.html weboldalon.

Elérhetőségek



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (Észak-Amerikán kívül)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

A termék címkéi

A terméken és a csomagolásán megjelenő címkéken látható szimbólumok teljes magyarázatát megtekintheti a support.illumina.com honlapon az Ön készletére vonatkozó *Documentation* (Dokumentáció) lapon található szimbólum ikonra kattintva.