

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Iepakojuma ieliktnis

TIKAI IN VITRO DIAGNOSTIKAS NOLŪKIEM. TIKAI EKSPORTAM.

Paredzētais lietojums

TruSight™ Oncology Comprehensive (ES) ir *in vitro* ir diagnostikas tests, kas izmanto mērķtiecīgu nākamās paaudzes sekvencēšanu, lai noteiktu variantus 517 gēnos, izmantojot nukleīnskābes, kas iegūtas no formalīnā fiksētiem, parafīnā iegultiem (FFPE) audzēja audu paraugiem no vēža pacientiem ar solidām ļaundabīgām neoplazmām, izmantojot Illumina® NextSeq™ 550Dx instrumentu. Testu var izmantot, lai noteiktu atsevišķu nukleotīdu variantus, multinukleotīdu variantus, insercijas, delēcijas un gēnu amplifikācijas no DNS, kā arī gēnu saplūšanas un salaidumu variantus no RNS. Tests arī ziņo audzēja mutācijas sloga (TMB) rezultātu un mikrosatelīta nestabilitātes (MSI) statusu.

Šis tests ir paredzēts kā palīgdiagnostika, lai identificētu vēža pacientus ārstēšanai ar [1. tabula](#) norādīto mērķēto terapiju saskaņā ar apstiprināto terapeitisko zāļu paredzēto pielietojumu. Turklāt tests ir paredzēts, lai sniegtu audzēja profilēšanas informāciju, ko drīkst izmantot kvalificēti veselības aprūpes speciālisti saskaņā ar profesionālajām vadlīnijām, un tas nav viennozīmīgs vai indikatīvs konkrēta terapeitiskā produkta lietošanai atbilstoši paredzētajam lietojumam.

1. tabula Palīgdiagnostikas indikācija

Audzēja veids	Biomarķieri	Mērķētā terapija
Solīdi audzēji	NTRK1, NTRK2 un NTRK3 gēnu saplūšanas	VITRAKVI® (larotreklinibs)

Analīzes kopsavilkums un skaidrojums

Klīniskais apraksts

Vēzis ir galvenais nāves cēlonis visā pasaulē, un tam ir potenciāls rasties jebkuros audos.^{1, 2} Vēža ģenētiskās bāzes analīze ir svarīga, lai identificētu pacientus, kas var gūt labumu no mērķētām terapijām, un jaunu ārstēšanas metožu izstrādei. Daudzi gēni ir saistīti ar vēža rašanos un progresēšanu, un daudziem vēžiem ir dažādi varianti, kas ietekmē šos gēnus un to funkcijas. Šie varianti var ietvert gēnu mutācijas, piemēram, viena nukleotīda variantus (SNV), vairāku nukleotīdu variantus (MNV), insercijas vai delēcijas, gēnu amplifikācijas, gēnu saplūšanas un salaidumu variantus. Vēl vienas vēža gēnu mutāciju sekas ir neoantigēnu klātbūtne, kas izraisa vēža specifiskās imūnās atbildes reakcijas. Vēža mutācijas stāvokli var attēlot ar TMB un MSI, kas ir ģenētiskie paraksti, saistīti ar genomisko nestabilitāti un vēža neoantigēnu prezentāciju.

TruSight Oncology Comprehensive ir kvalitatīva nākamās paaudzes sekvenčēšanas (NGS) visaptveroša genoma profilēšanas (CGP) analīze, kas plaši novērtē genoma variantus lielā panelī, kurš ietver ar vēzi saistītus gēnus, kas uzskaitīti 2. tabula. Analīze nosaka mazos variantus 517 gēnos, kā arī gēnu amplifikācijas, saplūšanas un salaidumu variantus, kā norādīts 2. tabula. Analīze nodrošina kodēšanas sekvences aptveršanu visiem gēniem, izņemot TERT, kam ir aptverts tikai promotora reģions, kā arī novērtē TMB rezultātu un MSI statusu. Šie analīzes mērķi ietver saturu, ko min profesionālas organizācijas un citas galvenās ASV vadlīnijas. TSO Comprehensive analīzes dizainu ietekmēja arī neatkarīgas apvienotās publikācijas un vēlīnā posma farmaceitiskie pētījumi.

To reģionu sarakstu, kuri ir izslēgti no variantu noteikšanas, skatiet *TruSight Oncology Comprehensive Block List (dokuments Nr. 200009524)*, kas pieejams Illumina [atbalsta vietnē](#).

2. tabula ir norādītas četras variantu veidu kategorijas: mazs DNS variants (S), gēnu amplifikācija (A), saplūšana (F) un salaidumu variants (Sp). Mazie DNS varianti ietver SNV, MNV, insercijas un delēcijas.

2. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes gēnu panelis

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

Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips	Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips	Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips
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

Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips	Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips	Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips
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	KOMPLEKTS	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

Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips	Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips	Nr.	Entrez ID	Gēns	Varianta tips
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

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

Procedūras principi

TSO Comprehensive (EU) analīze ir izkļiedes tests, kas tiek veikts manuāli, izmantojot ekstrahētu nukleīnskābi kā ievades materiālu. No formālīnā fiksētiem parafīnā iegūtiem (FFPE) audiem ekstrahēto DNS un/vai RNS izmanto, lai sagatavotu bibliotēkas, kuras pēc tam tiek bagātinātas, izmantojot ar vēzi saistus gēnus, un sekvencētas ar NextSeq 550Dx instrumentu.

TSO Comprehensive (EU) analīze ietver tālāk norādītos procesus.

- **Bibliotēkas sagatavošana un bagātināšana** — RNS gadījumā kopā 40 ng tiek pārveidota par divu pavedienu komplementāro DNS (cDNS). Genomiskā DNS (gDNS) gadījumā 40 ng gDNS tiek sadalīti mazos fragmentos. Universālie sekvencēšanas adapteri tiek līgēti pie cDNS un gDNS fragmentiem. P5 un P7 adapteru sekvences ir iekļautas katrā bibliotēkā, lai sekvencēšanas laikā varētu uztvert bibliotēkas fragmentus uz plūsmas elementa virsmas. Adapteri ietver i5 un i7 rādītāju sekvences, lai identificētu katru atsevišķo paraugu, un bibliotēkas no gDNS paraugiem ietver atsevišķas molekulas, izmantojot unikālos molekulāros identifikatorus (UMI). Pēc tam bibliotēkas tiek bagātinātas, lai noteiktu interesējošos gēnus, izmantojot uztveršanas metodi. Biotinilētas zondes secības, kas aptver interesējošos gēnu reģionus, uz kuriem attiecas analīze, tiek hibridizētas ar bibliotēkām. Zondes un hibridizētās mērķa bibliotēkas tiek izolētas no nemērķa bibliotēkām, piesaistot ar streptavidīna magnētiskajām daļiņām. Mērķa bagātinātās bibliotēkas tiek mazgātas un amplificētas. Pēc tam katras bagātinātās bibliotēkas daudzums tiek normalizēts, izmantojot uz lodītēm balstītu metodi, lai nodrošinātu vienādu apvienoto bibliotēku sadalījumu sekvencēšanai.
- **Sekvencēšana un primārā analīze** — normalizētas, bagātinātās bibliotēkas tiek apvienotas un sagrupētas ar plūsmas elementu un pēc tam sekvencētas NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot sekvencēšanu ar sintēzes (SBS) ķīmiju. SBS ķīmija izmanto atgriezenisko terminatora metodi, lai noteiktu atsevišķas, fluorescējoši iezīmētas dezoksinukleotīdu trifosfāta (dNTP) bāzes, kad tās ir iekļautas augošos DNS pavedienos. Katra sekvencēšanas cikla laikā nukleīnskābju ķēdei tiek pievienots viens dNTP. dNTP etiķete kalpo kā polimerizācijas terminators. Pēc katras dNTP iekļaušanas fluorescentā krāsviela tiek attēlota, lai identificētu bāzi, un pēc tam sadalīta, lai ļautu iekļaut nākamo nukleotīdu. Četras atgriezeniskas darbības terminatora dNTP (A, G, T un C) ir sastopamas kā atsevišķas molekulas. Tā rezultātā dabiskā konkurence samazina nepareizu iekļaušanu. Primārās analīzes laikā bāžu noteikšana tiek veikta tieši no signāla intensitātes mērījumiem katrā sekvencēšanas ciklā, kā rezultātā tiek iegūta bāžu secība. Katrai bāžu noteikšanai tiek piešķirts kvalitātes rādītājs.
- **Sekundārā analīze** — Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes modulis atrodas uz NextSeq 550Dx instrumenta kā daļa no Local Run Manager programmatūras, lai atvieglotu TSO Comprehensive (EU) izpildes iestatīšanu un veiktu sekvencēšanas rezultātu sekundāro analīzi. Sekundārā analīze ietver izpildes apstrādes un kvalitātes kontroles apstiprināšanu, kam seko demultipleksēšana, FASTQ failu ģenerēšana, savietošana un variantu noteikšana. Demultipleksēšana atdala datus no apvienotajām bibliotēkām, pamatojoties uz unikāliem sekvences indikatoriem, kas tika pievienoti bibliotēkas sagatavošanas procedūras laikā. Tiek ģenerēti FASTQ starpposma faili, kas ietver katra parauga sekvencēšanas nolasījumus un kvalitātes rādītājus, izņemot nolasījumus no klasteriem, kas neizgāja cauri filtram. Pēc tam sekvencēšanas nolasījumiem tiek veikta savietošanas procedūra ar atsauces genomu, lai identificētu saistību starp sekvencēm, un tiek piešķirts rezultāts, pamatojoties uz reģionu līdzībām. Savietotie nolasījumi tiek ierakstīti failos BAM formātā. Analīzes programmatūra izmanto atsevišķus algoritmus bibliotēkām, kas ģenerētas no DNS un/vai RNS paraugiem, lai DNS paraugiem noteiktu mazos DNS variantus, gēnu amplifikācijas, TMB un MSI, kā arī saplūšanas un salaidumu variantus RNS paraugos. Analīzes programmatūras modulis ģenerē vairākas izvades, tostarp sekvencēšanas parametrus un Variant Call Format (VCF) (Variantu noteikšanas formāta) failus. VCF failos ir informācija par atsauces genoma

konkrētajās pozīcijās atrastajiem variantiem. Katram paraugam tiek ģenerēti sekvencēšanas parametru un individuālie izvades faili. Sīkāku informāciju par sekundāro un terciāro analīzi skatiet *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedi (dokuments Nr. 200008661)*.

- **Terciārā analīze** — terciārā analīze, ko veic Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes modulis, sastāv no TMB un MSI aprēķiniem, palīgdiagnostikas noteikšanas, variantu audzēju profilēšanas divos klīniskās nozīmes līmeņos, izmantojot zināšanu bāzi (KB) un audu veidu, kā arī rezultātu atskaites izveides. Audzēja profilēšanu var saukt arī par visaptverošu genoma profilēšanu. Interpretēto variantu rezultāti un TMB un MSI biomarķieru rezultāti tiek apkopoti TSO Comprehensive (EU) rezultātu atskaitē.

Procedūras ierobežojumi

Tikai *in vitro* diagnostikas nolūkiem.

- Lietošanai tikai pēc ārsta norādījuma. Tests jāizmanto saskaņā ar klīniskās laboratorijas noteikumiem.
- Genoma atrades, kas uzskaitītas paredzētā lietojuma [2. tabula](#), nav norādījums vai secinājums noteikta terapeitiskā produkta izmantošanai pie konkrētas indikācijas.
- Variantiem, kas uzskaitīti TSO Comprehensive (EU) rezultātu atskaites sadaļā Genoma atrades ar pierādījumiem par klīnisku nozīmi (2. līmenis) un genoma atrades ar potenciālu klīnisko nozīmi (3. līmenis), klīniskā apstiprināšana nav veikta.
- Lēmumi par pacientu aprūpi un ārstēšanu jāpieņem, pamatojoties uz ārstējošā ārsta neatkarīgu medicīnisko spriedumu, ņemot vērā visu piemērojamo informāciju par pacienta stāvokli, piemēram, pacienta un ģimenes vēsturi, fizikāliem izmeklējumiem, informāciju no citiem diagnostiskajiem testiem un pacienta vēlmēm, saskaņā ar aprūpes standartu attiecīgajā sabiedrībā.
- FFPE paraugu kvalitāte ir ļoti mainīga. Paraugi, kuriem nav veiktas standarta fiksācijas procedūras, var neģenerēt ekstrahētas nukleīnskābes, kas atbilst analīzes kvalitātes kontroles prasībām ([Kvalitātes kontrole, 81. lpp.](#)). FFPE blokiem, kas ir uzglabāti ilgāk par pieciem gadiem, ir konstatēts samazināts derīgums.
- TSO Comprehensive (EU) veikspēja nav novērtēta ar paraugiem, kas iegūti no pacientiem, kuriem veikta orgānu vai audu transplantācija.
- Liels nekrotisko audu daudzums ($\geq 23\%$) var traucēt TSO Comprehensive (EU) analīzes iespēju noteikt gēnu amplifikācijas un RNS saplūšanas.
- Somatiskā virzošā mutācija var nebūt ticami konstatēta, ja audzēja saturs (pēc apgabala) ir mazāks par 20 %.
- Mikrosatelīta stabili (MS stabili) galarezultāts var būt neuzticams, ja audzēja saturs ir mazāks par 30%. Mikrosatelīta augsts (MSI-High) rezultāts ir pareizs neatkarīgi no audzēja satura.
- Hemoglobīns, kas saistīts ar audiem, samazina atbalsta lasījumus MET salaidumu variantiem.

- Ļoti pārkārtotos genomos ar delēcijām un heterozigotitātes zudumu TSO Comprehensive (EU) programmatūra var kļūdaini klasificēt DNS paraugu kā piesārņotu (CONTAMINATION_SCORE > 3106 un p vērtība > 0,049).
- Negatīvs rezultāts neizslēdz mutācijas klātbūtni zem analīzes noteikšanas robežām (LoD).
- Mazo DNS variantu noteikšanas jutīgumu var ietekmēt:
 - zemas sarežģītības genoma konteksts;
 - pieaugošs variantu garums.
- TMB rādītāji var būt neprecīzi tālāk norādītajā kontekstā:
 - ja audzēja saturs sasniedz līmeni, kurā sakrīt dzimumšūnu un somatisko šūnu variantu alēļu biežums (VAF);
 - populācijās, kas nav labi pārstāvētas publiskajās datu bāzēs.
- Gēnu amplifikācijas ir vienīgie kopiju skaita varianti, par kuriem ziņo TSO Comprehensive (EU). Analīze neziņo par gēnu delēcijām.
- Sapludināšanu noteikšanas algoritmi TSO Comprehensive (EU) analīzes programmatūrā var neņemt vērā pierādījumus no nolasījumiem, kas sniedzas ārpus anotēto gēnu robežām.
- Saplūšanas noteikšanas jutību var ietekmēt:
 - zema līmeņa bibliotēkas sarežģītība, kas izraisa samazinātus atbalstītus nolasījumus analīzes darbplūsmas noviržu dēļ (piemēram, skatiet maisīšanas darbības sadaļā [RNS denaturēšana un renaturēšana, 43. lpp.](#));
 - kad viens gēns aptver abus pārrāvumus;
 - gadījumos, kad vairāki saplūšanas pārrāvumi atrodas viens otram tuvu ar vienu vai vairākiem partneriem; vairāki pārrāvumi un partneri var tikt ziņoti kā viens pārrāvums un partneris;
 - pēc maziem vidējiem inserciju izmēriem. Nepieciešama minimālais vidējais insercijas izmērs, kas ir 80 bp, tomēr jutība samazinās 80–100 bp diapazonā;
 - kad ir zema līmeņa sekvenču sarežģītība vai homologs genoma konteksts ap saplūšanas pārrāvumiem.
- Saplūšanā iesaistīto gēnu izzušanu var ietekmēt, ja saplūšanas pārrāvumi notiek genoma reģionos, kas satur gēnus, kas pārklājas. Analīze ziņo par visiem gēniem, atdalot tos ar semikoloniem, ja pārrāvumu pārklāj vairāki gēni.
- Neviendabīgs pārklājums TERT promotora reģionā var izraisīt rezultātu trūkumu maza dziļuma dēļ.
- Anotācijas vai zināšanu bāzes kļūdas var izraisīt kļūdaini pozitīvu vai kļūdaini negatīvu rezultātu, tostarp varianta iekļaušanu nepareizā līmenī (starp Genoma atrades ar pierādījumiem par klīnisku nozīmi [2. līmenis] un genoma atrades ar potenciālu klīnisku nozīmi [3. līmenis]), vai anotāciju informācija atskaitē var būt nepareiza. CDx rezultātos ziņotos variantus neietekmē anotācijas vai zināšanu bāzes kļūdas. Kļūdas iespēja pastāv no šādiem trim avotiem.
 - TSO Comprehensive (EU) varianta anotācija. Kļūdas biežums ir aptuveni 0,0027 %, pamatojoties uz 2 448 350 variantu analīzi no COSMIC v92, tāpēc kļūdu iespējamība ir maza.
 - Zināšanu bāzes kļūda atlasē procesa dēļ.

- Zināšanu bāzes satura atbilstība laika gaitā mainās. Atskaite atspoguļo zināšanas, kas ir zināšanu bāzes versijas izveides laikā.
- TSO Comprehensive (EU) ir paredzēts, lai ziņotu par somatiskiem variantiem, kad tiek ziņots par variantiem ar klīniski nozīmīgiem pierādījumiem vai variantiem ar potenciālu klīnisko nozīmi. Tā kā tas ir tikai audzēja tests, ziņošana par dzimumšūnu (mantotiem) variantiem ir iespējama, bet netiek apzināti veikta. TSO Comprehensive (EU) izmanto zināšanu bāzi, lai ziņotu par variantiem, skaidri nenorādot, vai tie ir dzimumšūnu vai somatiskās izcelsmes.
- Zināšanu bāze ietver tikai terapeitiskās, diagnostiskās un prognostiskās saistības, kas ir atbilstošas variantiem, kuri atrodas noteiktā solīdā ļaundabīgā jaunveidojumā. Zināšanu bāzē nav iekļauta uzņēmības vai vēža riska saistība.
- Nākamajā tabulā ir parādītas nukleotīdu izmaiņas trim RET variantiem, kurus analīze nevar noteikt. Var tikt noteiktas citas nukleotīdu izmaiņas tām pašām aminoskābju izmaiņām.

3. tabula Nukleotīdu izmaiņas trim RET variantiem

Aminoskābes izmaiņas	Chr*	Pozīcija	Atsauces alēle	Alternatīva
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

* Chr = hromosoma

Izstrādājumu komponenti

TSO Comprehensive (EU) analīze sastāv no tālāk norādītajiem komponentiem.

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) komplekts (Illumina kataloga Nr. 20063092) — komplektā ir iekļauti reaģenti ar pietiekamu tilpumu, lai ģenerētu 24 DNS un 24 RNS bibliotēkas. Apjoms ietver pacientu paraugus un kontroles. Kontroles tiek pārdotas atsevišķi (skatiet sadaļu [Nepieciešamie reaģenti, kas netiek nodrošināti, 17. lpp.](#)).
- Zināšanu bāze: Regulāri atjaunināta un pieejama lejupielādei Illumina Lighthouse portālā.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes modulis (Illuminakatalogs Nr. 20051843), kas ietver šādus komponentus:

- TSO Comprehensive pretenziju pakas;
- TSO Comprehensive programmatūras komplekts;
- TSO Comprehensive USB komplekts.

illumina servisa pārstāvis instalē atbilstošo TSO Comprehensive (EU) analīzes modulis versiju Local Run Manager NextSeq 550Dx instrumentā. Informāciju par analīzes moduli skatiet Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedi (dokuments Nr. 200008661).

Reaģenti

Nodrošinātie reaģenti

TSO Comprehensive (EU) komplektā ir iekļauti turpmāk norādītie reaģenti.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Reaģents	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	Aktīvās sastāvdaļas	Uzglabāšanas temperatūra
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus un nukleotīdus	No -25 °C līdz -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus, DNA polymerase, RNāzi H un nukleotīdus	No -25 °C līdz -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus un nejaušus heksamērus	No -25 °C līdz -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur reverse transcriptase	No -25 °C līdz -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Sasaldēts), PN 20031118

Reaģents	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	Aktīvās sastāvdaļas	Uzglabāšanas temperatūra
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur T4 DNA polimerāzi un polinukleotīdu kināzi	No -25 °C līdz -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus un nukleotīdus	No -25 °C līdz -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus	No -25 °C līdz -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur ligāzi	No -25 °C līdz -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur universālos sekvencēšanas oligonukleotīdus	No -25 °C līdz -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur universālos sekvencēšanas oligonukleotīdus	No -25 °C līdz -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus	No -25 °C līdz -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur DNA polimerāzi un nukleotīdus	No -25 °C līdz -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Atdzesēts), PN 20031119

Reaģents	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	Aktīvās sastāvdaļas	Uzglabāšanas temperatūra
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus	No 2 °C līdz 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Ūdens šķīdums, kas satur magnētiskas lodītes	No 2 °C līdz 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA šķīdums	No 2 °C līdz 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

Aktīvās sastāvdaļas: Buferēts ūdens šķīdums, kas satur oligonukleotīdu praimerus ar atsevišķu svītrkodu.

**UZMANĪBU!**

RNS vai DNS paraugiem izmantojiet unikālos indeksēšanas praimerus (UPxx). Nekombinējiet CPxx un UPxx indeksēšanas praimerus kopā vienā bibliotēkā.

Indeksēšanas praimeris	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	i7 Index	i7 Sequence	i5 Index	i5 Sequence	Uzglabāšanas temperatūra
UP01	20031445	1	24 µl	D702	TCCGGAGA	D503	AGGATAGG	No -25 °C līdz -15 °C
UP02	20031446	1	24 µl	D707	CTGAAGCT	D504	TCAGAGCC	No -25 °C līdz -15 °C
UP03	20031447	1	24 µl	D717	CGTAGCTC	D509	CATCCGAA	No -25 °C līdz -15 °C
UP04	20031448	1	24 µl	D706	GAATTCGT	D510	TTATGAGT	No -25 °C līdz -15 °C
UP05	20031449	1	24 µl	D712	AGCGATAG	D513	ACGAATAA	No -25 °C līdz -15 °C
UP06	20031450	1	24 µl	D724	GCGATTAA	D515	GATCTGCT	No -25 °C līdz -15 °C
UP07	20031451	1	24 µl	D705	ATTCAGAA	D501	AGGCTATA	No -25 °C līdz -15 °C
UP08	20031452	1	24 µl	D713	GAATAATC	D502	GCCTCTAT	No -25 °C līdz -15 °C
UP09	20031453	1	24 µl	D715	TTAATCAG	D505	CTTCGCCT	No -25 °C līdz -15 °C
UP10	20031454	1	24 µl	D703	CGCTCATT	D506	TAAGATTA	No -25 °C līdz -15 °C
UP11	20031455	1	24 µl	D710	TCCGCGAA	D517	AGTAAGTA	No -25 °C līdz -15 °C
UP12	20031456	1	24 µl	D701	ATTACTCG	D518	GACTTCCT	No -25 °C līdz -15 °C
UP13	20031457	1	24 µl	D716	ACTGCTTA	D511	AGAGGCGC	No -25 °C līdz -15 °C
UP14	20031458	1	24 µl	D714	ATGCGGCT	D512	TAGCCGCG	No -25 °C līdz -15 °C
UP15	20031459	1	24 µl	D718	GCCTCTCT	D514	TTCGTAGG	No -25 °C līdz -15 °C
UP16	20031460	1	24 µl	D719	GCCGTAGG	D516	CGCTCCGC	No -25 °C līdz -15 °C

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Aktīvās sastāvdaļas: Buferēts ūdens šķīdums, kas satur oligonukleotīdu praimerus ar atsevišķu svītrkodu.

**UZMANĪBU!**

Izmantojiet kombinētos indeksēšanas praimerus (CPxx) tikai DNS paraugiem. Nekombinējiet CPxx un UPxx indeksēšanas praimerus kopā vienā bibliotēkā.

Indeksēšanas praimeris	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	i7 Index	Sekvencēšana	i5 Index	Sekvencēšana	Uzglabāšanas temperatūra
CP01	20031461	1	20 µl	D721	KATCGAGG	D507	ACGTCCTG	No -25 °C līdz -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	No -25 °C līdz -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	No -25 °C līdz -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	No -25 °C līdz -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	No -25 °C līdz -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	No -25 °C līdz -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	No -25 °C līdz -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	KATCGAGG	D508	GTCAGTAC	No -25 °C līdz -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	No -25 °C līdz -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	No -25 °C līdz -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	KATCGAGG	D519	CCGTCGCC	No -25 °C līdz -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	No -25 °C līdz -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	No -25 °C līdz -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	KATCGAGG	D520	GTCCGAGG	No -25 °C līdz -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	No -25 °C līdz -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	No -25 °C līdz -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Atdzesēts), PN 20031123

Reāģents	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	Aktīvās sastāvdaļas	Uzglabāšanas temperatūra
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur formamīdu un sāļus	No 2 °C līdz 8 °C

Reaģents	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	Aktīvās sastāvdaļas	Uzglabāšanas temperatūra
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus un cietās fāzes paramagnētiskas lodītes, kas kovalenti pārklātas ar streptavidīnu	No 2 °C līdz 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Nātrija hidroksīda šķīdums	No 2 °C līdz 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Buferēts ūdens šķīdums	No 2 °C līdz 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur cietās fāzes paramagnētiskas lodītes.	No 2 °C līdz 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus, 2-merkaptoetanolu un formamīdu.	No 2 °C līdz 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus	No 2 °C līdz 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus	No 2 °C līdz 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Ūdens šķīdums, kas satur magnētiskas lodītes	No 2 °C līdz 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Sasaldēts), PN 20031121

Reāģents	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	Aktīvās sastāvdaļas	Uzglabāšanas temperatūra
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur oligonukleotīdus.	No -25 °C līdz -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus	No -25 °C līdz -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur mazgāšanas līdzekli	No -25 °C līdz -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur DNA polimerāzi un nukleotīdus	No -25 °C līdz -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur P5 un P7 praimerus	No -25 °C līdz -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur sāļus, 2- merkaptoetanolu un formamīdu.	No -25 °C līdz -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 vai PhiX)	20031492	1	10 µl	Buferēts ūdens šķīdums, kas satur PhiX genoma DNS	No -25 °C līdz -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reāģents	Daļas numurs	Daudzums	Tilpums	Aktīvās sastāvdaļas	Uzglabāšanas temperatūra
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotīdu zondes kopa	No -25 °C līdz -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotīdu zondes kopa	No -25 °C līdz -15 °C

Nepieciešamie reaģenti, kas netiek nodrošināti

Pirmsamplifikācijas reaģenti

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents — reaģentu prasības skatiet sadaļā [Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana, 27. lpp.](#).
- DNA and RNA Quantification Reagents — reaģentu prasības skatiet sadaļā [Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana, 27. lpp.](#).
- TruSight Oncology kontroles:
 - TruSight Oncology DNS kontrole (Illumina kataloga Nr. 20065041);
 - TruSight Oncology RNS kontrole (Illumina kataloga Nr. 20065042)
- Ethanol (EtOH) 100 % (200 stiprums), molekulārajai bioloģijai
- RNase/DNase-free water

Pēcampļifikācijas reaģenti

- NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) (Illumina kataloga Nr. 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cikli)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cikli)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cikli)
- EtOH 100 % (200 stiprums), molekulārajai bioloģijai
- RNase/DNase-free water

Reaģentu uzglabāšana un rīkošanās ar tiem

Tālāk norādīto reaģentu kastes tiek piegādātas sasaldētas. Uzglabāt no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā.

Kaste	Daļas numurs	Laboratorijas zona
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pirms amplifikācijas
TruSight Oncology Comp Library Prep (Sasaldēts)	20031118	Pirms amplifikācijas
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pirms amplifikācijas

Kaste	Daļas numurs	Laboratorijas zona
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pirms amplifikācijas
TruSight Oncology Comp Enrichment (Sasaldēts)	20031121	Pēc amplifikācijas
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Pēc amplifikācijas

**UZMANĪBU!**

Neuzglabāriet reaģentus uzglabāšanas iekārtā ar automātisko atkausēšanu vai ledusskapja durvju nodalījumos.-

Tālāk norādītās reaģentu kastes tiek piegādātas uz gela iepakojumiem, lai uzturētu no 0 °C līdz 10 °C temperatūru. Uzglabāt no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā.

Kaste	Daļas numurs	Laboratorijas zona
TruSight Oncology Comp Library Prep (Atdzesēts)	20031119	Pirms amplifikācijas
TruSight Oncology Comp Enrichment (Atdzesēts)	20031123	Pēc amplifikācijas

**UZMANĪBU!**

Nesasaldējiet reaģentus, kas satur lodītes (LNB1, SPB un SMB).

- Reaģentu fiziskas izskata izmaiņas var norādīt uz materiālu bojājumu. Ja notiek fiziskas izskata izmaiņas (piemēram, reaģentu krāsas izmaiņas vai duļķainība), nelietojiet reaģentus.
- FSM, SSM, ERA1-B un TCB1 var būt ar izstrādājumu saistītas daļiņas. Ievērojiet katram reaģentam specifiskās rīkošanās vadlīnijas. Pēc FSM un SSM sajaukšanas darbību veikšanas atlikušās baltās ar izstrādājumu saistītās daļiņas neietekmēs veikspēju.
- TSO Comprehensive (EU) analīzes stabilitāte ir novērtēta un veikspēja ir pierādīta līdz četrām komplekta lietošanas reizēm. Reaģenti ir stabili, ja tiek glabāti norādītajās temperatūrās līdz norādītajam derīguma termiņa beigu datumam, kas norādīts uz kastes etiķetes.

Aprīkojums un materiāli

Nepieciešamais aprīkojums un materiāli, kas netiek nodrošināti

Pirmsamplifikācijas lekārtas un materiāli

Aprīkojums	Piegādātājs
Ultraskaņas ierīce ar saistītiem piederumiem DNS Ultraskaņas apstrādes ierīces iestatījumi DNS fragmentēšanai, 23. lpp.	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Amplifikators ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> apsildāms vāks, ko var iestatīt uz 30 °C un 100 °C (vai var izslēgt, ja nevar iestatīt uz 30 °C); ietver temperatūras diapazonu no 4 °C līdz 99 °C; temperatūras precizitāte ±0,25 °C; saderīgs ar 96 iedobju PCR platēm, 0,2 ml; skatiet sadaļu Amplifikatora uzsilšanas ātrums, 24. lpp. 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Virpuļmaisītājs	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Mikroparaugu inkubatori (2) ar ieliktniem 96 iedobju MIDI platēm (2).	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Mikrocentrifūga	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Plates centrifūga ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> saderīgs ar 96 iedobju mikroplatēm; spēj radīt 280 × g (+/- 10%) 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Plates kratītājs ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> 2 mm orbīta; spēj kratīt ar 1200 apgr./min un 1800 apgr./min 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Noslēgšanas ķīlis vai rullītis	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Magnētiskais statīvs ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> paredzēts paramagnētisko lodīšu izgulsnēšanai/atdalīšanai; magnēti statīva sānos (nevis apakšā); saderīgs ar 96 iedobju MIDI platēm 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs

Aprīkojums	Piegādātājs
<p>Precīzijas pipetes, kas spēj precīzi ievadīt tilpumus no 2 µl līdz 1000 µl ar turpmāk norādītajām specifikācijām.</p> <ul style="list-style-type: none"> Viena vai vairāku kanālu pipete ar 0,02 µl soli Viena vai vairāku kanālu pipete ar 0,1 µl, 0,2 µl, vai 0,5 µl Viena vai vairāku kanālu pipete ar 1 µl vai 2 µl soli <p>Pipetes ir regulāri jākalibrē un tām jābūt precīzām 5 % robežās no norādītā tilpuma.</p>	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Pipešu palīginstrumenti	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Ledus vai aukstuma bloks	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
10 ml seroloģiskās pipetes	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
<p>Pašlīpošie noslēgi 96 iedobju platēm ar šādām specifikācijām:</p> <ul style="list-style-type: none"> noplēšami; piemēroti PCR platēm ar pilnu vai daļēju apmali; izturīga līme, kas spēj izturēt vairākas temperatūras izmaiņas -20 °C līdz 100 °C; nesatur ribonukleāzi/dezoksiribonukleāzi. 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Mikrocentrifūgas stobriņi ar 1,7 ml ietilpību, nesatur nukleāzi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Nukleāzi nesaturoši reaģenta rezervuāri (vienreizlietojamas teknes, 50 ml) (vai līdzvērtīgi)	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
15 ml konusveida stobriņi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
50 ml konusveida stobriņi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Saderīgi, pret aerosolu izturīgi pipetes uzgaļi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
96 iedobju uzglabāšanas plates, 0,8 ml (MIDI plates)	Fisher Scientific, daļas Nr. AB-0859 vai līdzvērtīgas
96 iedobju PCR plates saderīgas ar amplifikatoru, 0,2 ml (polipropilēna iedobes)	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs

Pēcamplifikācijas iekārtas un materiāli

Aprīkojums	Piegādātājs
NextSeq 550Dx instruments	illumina, kataloga Nr. 20005715
Plates centrifūga ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> saderīgs ar 96 iedobju mikroplatēm Spēj radīt 280 × g (+/- 10%) 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Amplifikators ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> apsildāms vāks(100 °C); ietver temperatūras diapazonu no 4 °C līdz 99 °C; temperatūras precizitāte ±0,25 °C; saderīgs ar 96 iedobju PCR platēm, 0,2 ml; skatiet sadaļu Amplifikatora uzsilšanas ātrums, 24. lpp. 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Virpuļmaisītājs	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Mikroparaugu inkubators ar ieliktni 96 iedobju MIDI platēm	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Sausais siltumbloks ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> temperatūras diapazons no 25 °C līdz 99 °C; temperatūras precizitāte ±5 °C; pārliecinieties, ka mikrocentrifūgas stobriņi ir saderīgi ar siltumbloku 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Plates kratītājs ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> 2 mm orbīta; spēj kratīt ar 1200 apgr./min un 1800 apgr./min 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Mikrocentrifūga	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Noslēgšanas ķīlis vai rullītis	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Magnētiskais statīvs ar šādām specifikācijām: <ul style="list-style-type: none"> paredzēts paramagnētisko lodīšu izgulsnēšanai/atdalīšanai; magnēti statīva sānos (nevis apakšā); saderīgs ar 96 iedobju MIDI platēm 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs

Aprīkojums	Piegādātājs
<p>Precīzijas pipetes, kas spēj precīzi ievadīt tilpumus no 2 µl līdz 1000 µl ar turpmāk norādītajām specifikācijām.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Viena vai vairāku kanālu pipete ar 0,02 µl soli • Viena vai vairāku kanālu pipete ar 0,1 µl, 0,2 µl vai 0,5 µl soli • Viena vai vairāku kanālu pipete ar 1 µl vai 2 µl soli <p>Pipetes ir regulāri jākalibrē un tām jābūt precīzām 5 % robežās no norādītā tilpuma.</p>	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Pipešu palīginstrumenti	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
10 ml seroloģiskās pipetes	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
<p>Pašlīpošie noslēgi 96 iedobju platēm ar šādām specifikācijām:</p> <ul style="list-style-type: none"> • noplēšami; • piemēroti PCR platēm ar pilnu vai daļēju apmali; • izturīga līme, kas spēj izturēt vairākas temperatūras izmaiņas -20 °C līdz 100 °C; • nesatur ribonukleāzi/dezoksiribonuleāzi 	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Mikrocentrifūgas stobriņi ar 2 ml ietilpību, nesatur nukleāzi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Mikrocentrifūgas stobriņi ar 1,7 ml ietilpību, nesatur nukleāzi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Nukleāzi nesaturoši reaģenta rezervuāri (vienreizlietojamas teknes, 50 ml) (vai līdzvērtīgi)	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
15 ml konusveida stobriņi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
50 ml konusveida stobriņi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Saderīgi, pret aerosolu izturīgi pipetes uzgaļi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
96 iedobju uzglabāšanas plates, 0,8 ml (MIDI plates)	Fisher Scientific, daļas Nr. AB-0859 vai līdzvērtīgas
96 iedobju PCR plates saderīgas ar amplifikatoru, 0,2 ml (polipropilēna iedobes)	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs
Ledus vai aukstuma bloks	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs

Ultraskaņas apstrādes ierīces iestatījumi DNS fragmentēšanai

DNS fragmentēšana vai sadalīšana ietekmē analīzes veikspēju, nosakot fragmenta izmēra sadalījumu, kas savukārt ietekmē sekvenčēšanas pārklājumu. TSO Comprehensive (EU) analīzei tika izvērtētas un optimizētas vairākas fokusētas apstrādes ar ultraskaņu konfigurācijas (4. tabula).

- Sadalīšanas laiks tika pielāgots, lai maksimāli palielinātu MEDIAN_EXON_COVERAGE parametru, kas aprakstīts sadaļā *Kvalitātes kontrole, 81. lpp.*. Sadalīšanas laiki (skatiet 4. tabula) un MEDIAN_INSERT_SIZE rezultāti dažādās konfigurācijās bija atšķirīgi.
- 1. – 4. un 6. konfigurācija tika testētas ar 8 joslu stikla mēģenēm. 5. konfigurācijā tika izmantota viena stikla caurule. Stobriņu tilpumi ir parādīti 4. tabula.
- 3. – 6. konfigurācijas optimizācija (mazāks ūdens vannas tilpums) izmantoja impulsus.
- 3.–5. konfigurācija tika nogriezta mazāka tilpuma mēģenēs. Stobriņu tilpums ietekmē sadalīšanas parametrus.
- 4. konfigurācijai (līnijas devējs, vidēja izmēra ūdens vannas tilpums, degazēts ūdens) bija nepieciešams ilgš impulsa aiztures laiks (40 sekundes), lai sasniegtu līdzīgu MEDIAN_EXON_COVERAGE kā 1. un 2. konfigurāciju ar nominālo 40 ng ievadi.
- Optimālie iestatījumi 3. konfigurācijai izraisīja nedaudz lielāku fragmentu izmēru izkliedi salīdzinājumā ar citām konfigurācijām (MEDIAN_INSERT_SIZE bija par aptuveni par 5–10 bāžu pāriem lielāks).
- 3. un 5. konfigurācijā izmanto negāzētu ūdeni un mazāko ūdens peldes tilpumu.
- 3. un 5. konfigurācijai bija nepieciešama palielināta DNS ievade (50 ng — 3. konfigurācijai, 60 ng — 5. konfigurācijai), lai sasniegtu līdzīgu MEDIAN_EXON_COVERAGE salīdzinājumā ar pārējām 4 konfigurācijām, kurās tika izmantota nominālā 40 ng ievade.
- 3. un 5. konfigurācijai ir vairāk bojājumu un/vai denaturācijas, līdz ar to mazāka izmantojamo dsDNS molekulu efektīvā masa bibliotēkas sagatavošanai.

Centrifugējiet sadalīšanas stobriņus atjaunošanās procesa laikā, lai nodrošinātu, ka norādītais tilpums tiek atgūts, jo jebkurš materiāla zudums var negatīvi ietekmēt veikspēju.

4. tabula Novērtētās fokusētas ultraskaņas iekārtas konfigurācijas

Parametrs	Konfigurācija					
	1	2	3	4	5	6
Pārveidotājs	Līnija	Punkts	Punkts	Līnija	Punkts	Līnija
Ūdens peldes tilpums	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Ūdens atgāzēts	Jā	Jā	Nē	Jā	Nē	Jā
Ūdens dzesētājs	Jā	Jā	Jā	Jā	Jā	Jā
Ūdens vannas temperatūra	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Maksimālā incidenta jauda (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% darba koeficients	30	10	30	25	20	25
Cikli uz vienu impulsu	200	200	1000	1000	1000	600
Pulsēšana (10 sekunžu impulsi)	Nē	Nē	Jā	Jā	Jā	Jā
Pulsēšanas aiztures laiks	Nav	Nav	10 s	40 s	10 s	10 s
Sadalīšanas laiks	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Paraugu apstrāde	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Partijas izmērs	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Stikla 8 slokšņu stobriņa parauga izmērs	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Viens stobriņš (50 µl)	130 µl (vai 96 mikroTUBE plate)
Dithering	Nav	Nav	Nav	3 mm Y @ 20 mm/s	Nav	1,5 mm Y pie 10 mm/s
DNS ievades ekvivalents (vidējam eksonu pārklājumam)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ 200 sekunžu sadalīšanas laiks sastāv no 10 sekunžu impulsiem ar 20 atkārtojumiem.

² 320 sekunžu sadalīšanas laiks sastāv no 10 sekunžu impulsiem ar 32 atkārtojumiem.

Amplifikatora uzsilšanas ātrums

Amplifikatora uzsilšanas ātrums ietekmē analīzes kvalitātes kontroles parametrus — (Usable MSI Sites (Izmantojamās MSI vietas), Median Bin Count CNV Target (CNV mērķa nolasišanas skaita mediāna), Median Insert Size (Ieliktna izmēra mediāna) (RNS)), un atbalsta nolasiņumus salaidumu variantiem un saplūšanām.

leteicama amplifikatora uzsilšanas ātruma optimizēšana. Piemēram, testētais modelis tika pielāgots no noklusējuma (un maksimālā) uzsilšanas ātruma, kas ir 5 °C/s, uz 3 °C/s, lai iegūtu ar citiem modeļiem salīdzināmus rezultātus ar zemāku noklusējuma uzsilšanas ātrumu.

Paraugu ņemšana, transportēšana un uzglabāšana

Paņemot, transportējot, uzglabājot un apstrādājot paraugus, ievērojiet standarta procedūru.

Paraugu prasības

FFPE audi

TSO Comprehensive (EU) analīzei ir nepieciešami 40 ng RNS un/vai 40 ng DNS, kas ekstrahēta no FFPE audiem. Izmantojot gan RNS, gan DNS, var analizēt visus pieprasītos variantu veidus. Audi jāfiksē, izmantojot formālīna fiksatoru, kas piemērots molekulārām analīzēm (piemēram, 10 % neitrāli buferētu formālīnu). Audus nedrīkst atkaļķot. Pirms TSO Comprehensive (EU) analīzes veikšanas patologam jāpārbauda audu paraugs, lai nodrošinātu, ka tas ir piemērots šim testam. Lai noteiktu somatiskās virzītāja mutācijas, ir nepieciešams vismaz 20 % audzēja saturs (pēc reģiona). Uzticamai MSI statusa noteikšanai dažādos paraugos ir nepieciešams vismaz 30 % audzēja saturs. Ja paraugs tiek testēts ar mazāk nekā 30 % audzēja saturu, lai noteiktu rezultātus ar citiem variantu veidiem, MS-Stable rezultāts var būt neuzticams. MSI-High rezultāts ir pareizs neatkarīgi no audzēja satura.

Audzēja saturs gēnu amplifikācijai un RNS variantiem ir atkarīgs no amplifikācijas vai saplūšanas ekspresijas apmēra (skatiet sadaļu [Audzēju saturs, 103. lpp.](#)).

Lai ar lielu ticamību izgūtu 40 ng RNS un 40 ng DNS no dažādiem cietiem audu veidiem, ieteicamais audu tilpums ir $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Šis tilpums ir līdzvērtīgs kumulatīvajam dzīvotspējīgajam audu laukumam $\geq 200 \text{ mm}^2$, izmantojot 5 μm biezus griezumus, vai $\geq 100 \text{ mm}^2$, izmantojot 10 μm biezus griezumus. Kumulatīvais audu laukums ir dzīvotspējīgu audu laukuma summa visos griezumos, kas nodoti ekstrakcijai. Piemēram, kumulatīvo audu laukumu 200 mm^2 var iegūt, ekstrahējot četrus 5 μm griezumus ar 50 mm^2 audu laukumu katrā vai piecus 10 μm griezumus ar 20 mm^2 audu laukumu katrā. Audu nekroze var samazināt nodrošināto nukleīnskābju daudzumu. Lai samazinātu kļūdaini negatīvu rezultātu iespējamību, audiem var veikt makrodisekciju, lai sasniegtu vēlamu dzīvotspējīgu audzēja saturu.

Liels nekrotisko audu daudzums ($\geq 23 \%$) var traucēt TSO Comprehensive (EU) analīzes iespēju noteikt gēnu amplifikācijas un RNS saplūšanas. Ja parauga daļā ir vairāk nekā 23 % nekrozes kopējā audu apgabalā, tad jāveic nekrotisko audu makrodisekcija. Ja laboratorijā ar analīzi tiek apstrādāta RNS, jāizvairās no audiem ar hemoglobīna saturu vai tas jāsamazina, iegūstot griezumus no audu bloka. Skatiet sadaļu [Traucējošās vielas, 94. lpp.](#)

Uz priekšmetstikliņiem piestiprinātos FFPE audus var uzglabāt līdz 28 dienām istabas temperatūrā.

Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana

- Ekstrahējiet RNS un DNS no FFPE audu paraugiem, izmantojot komerciāli pieejamus ekstrakcijas komplektus. Atšķirības ekstrakcijas komplektos var ietekmēt veiktspēju. Skatiet sadaļu [Nukleīnskābju ekstrakcijas komplekta novērtējums, 93. lpp.](#)
- Nepalieliniet K proteīnāzi vai līdzvērtīga enzīma koncentrāciju ekstrakcijas laikā, salīdzinot ar standarta koncentrāciju, kas norādīta ekstrakcijas komplektā. Skatiet sadaļu [Traucējošās vielas, 94. lpp.](#)
- Uzglabājiet ekstrahētās sagataves nukleīnskābes, ievērojot ekstrakcijas komplekta ražotāja norādījumus.
- Uzglabājiet ekstrahēto DNS līdz 28 dienām -25 °C līdz -15 °C temperatūrā.
- Uzglabājiet ekstrahēto RNS līdz 28 dienām -85 °C līdz -65 °C temperatūrā.
- Lai izvairītos no koncentrācijas izmaiņām laika gaitā, izmēriet DNS un RNS 28 dienu laikā pirms bibliotēkas sagatavošanas uzsākšanas. Kvantificējiet RNS un DNS, izmantojot fluorometriskās kvantificēšanas metodi, kas izmanto krāsvielas, kuras piesaistās nukleīnskābēm. Nukleīnskābju koncentrācijai jābūt vidējai vērtībai no vismaz trīs mērījumiem.
- Lai veiktu analīzi, ir nepieciešami 40 ng katra RNS parauga, kas sagatavots ar RNase/DNase-free water (nav iekļauts komplektā), ar galīgo tilpumu 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Lai veiktu analīzi, nepieciešami 40 ng katra gDNS parauga ar minimālo ekstrakcijas koncentrāciju 3,33 ng/µl. Sadalīšanai nepieciešams galīgais tilpums 52 µl (0,77 ng/µl) ar vismaz 40 µl TEB (iekļauts komplektā), ko izmanto kā šķīdinātāju.

Bibliotēku uzglabāšana

Uzglabājiet bibliotēkas PCR platēs ar mazu saistīšanas spēju no 7 līdz 32 dienām atkarībā no bibliotēkas veida (skatiet [5. tabula](#)).

5. tabula Bibliotēku uzglabāšanas laiki

Bibliotēkas tips	Plate	Dienu skaits	Uzglabāšanas temperatūra
cDNA	PCF PCR	≤ 7	No -25 °C līdz -15 °C
gDNS fragmentēšana	LP PCR	≤ 7	No -25 °C līdz -15 °C
Iepriekšēja bagātināšana	ALS PCR	≤ 30	No -25 °C līdz -15 °C
Pēc bagātināšanas	ELU2 PCR	≤ 7	No -25 °C līdz -15 °C
PCR pēc bagātināšanas	PL PCR	≤ 30	No -25 °C līdz -15 °C
Normalizēts	NL PCR	≤ 32	No -25 °C līdz -15 °C

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Drošums



BRĪDINĀJUMS

Šajā reaģentu komplektā ir potenciāli bīstamas ķīmiskās vielas. Ieelpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Ventilācijai jābūt piemērotai darbam ar bīstamiem materiāliem reaģentos. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimdus un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Apejieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem. Papildinformācija par vidi, veselību un drošumu pieejama drošības datu lapā vietnē support.illumina.com/sds.html.

- Rīkojieties ar visiem paraugiem, it kā būtu zināms, ka tie ir infekciozi.
- Ievērojiet parastos laboratorijas piesardzības pasākumus. Nelietojiet pipeti, izmantojot muti. Neēdiet, nedzeriet un nesmēķējiet noteiktās darba zonās. Rīkojieties ar paraugiem un analīžu reaģentiem, valkājiet vienreizlietojamus cimdus un laboratorijas uzsvārcus. Pēc paraugu un analīžu reaģentu izmantošanas rūpīgi nomazgājiet rokas.

Laboratorija

- Lai novērstu piesārņojumu, organizējiet laboratoriju ar vienvirziena darbplūsmu. Pirmsamplifikācijas un pēcamplifikācijas zonās ir nepieciešams atsevišķs aprīkojums un materiāli (piemēram, pipetes, pipešu uzgaļi, virpinātājs un centrifūga). Lai novērstu amplifikācijas produkta vai zondes pārnesanu, izvairieties no atgriešanās pirmsamplifikācijas zonā, kad esat nonācis pēcamplifikācijas zonā.
- Veiciet PCR indeksēšanas un bagātināšanas darbības pēcamplifikācijas zonā, lai novērstu amplifikācijas produktu pārnesanu.
- Bibliotēkas sagatavošanas procedūrām ir nepieciešama vide, kurā nav RNāze/DNāze.- Rūpīgi attīriet darba zonas ar RNāzi/DNāzi inhibējošu tīrīšanas līdzekli.- Izmantojiet plastmasu, kas ir sertificēta kā DNāzi, RNāzi un cilvēka genoma DNS nesaturoša.
- Pēcamplifikācijas procedūrām rūpīgi notīriet darba virsmas un aprīkojumu pirms un pēc katras procedūras ar svaigi pagatavotu 0,5 % nātrija hipohlorīta (NaOCl) šķīdumu. Ļaujiet šķīdumam saskarties ar virsmām 10 minūtes un pēc tam rūpīgi noslaukiet ar 70 % etilspirtu vai izopropilspirtu.
- Izmantojiet nukleāzi nesaturošus mikrocentrifūgas stobriņus, plates, pipešu uzgaļus un rezervuārus.
- Izmantojiet kalibrētu aprīkojumu visā analīzes laikā. Nodrošiniet, ka aprīkojums ir kalibrēts atbilstoši šajā protokolā norādītajiem ātrumiem, temperatūrām un tilpumiem.
- Izmantojiet precīzās pipetes, lai nodrošinātu precīzu reaģentu un paraugu ievadīšanu. Veiciet regulāru kalibrēšanu saskaņā ar ražotāja specifikācijām.

- Izmantojot daudzkanālu pipetes, ievērojiet šādas vadlīnijas.
 - Pipetējiet vismaz $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Pārliedcinieties, ka barjeras uzgaļi ir labi uzstādīti un piemēroti daudzkanālu pipetes zīmolam un modelim.
 - Piestipriniet uzgaļus ar apļveida kustību, lai nodrošinātu, ka visi uzgaļi ir vienlīdz labi piestiprināti.
 - Aspirējiet 90° leņķī ar vienādu šķidrums daudzumu visos uzgaļos.
 - Samaisiet visas sastāvdaļas pēc ievadīšanas, pipetējot reakcijas maisījumu augšup un lejup.
 - Pēc ievadīšanas pārliedcinieties, ka šķidrums tiek pilnībā ievadīts no katra uzgaļa.
- Pārliedcinieties, ka izmantojat analīzei norādīto aprīkojumu un iestatiet programmas, kā norādīts.
- Norādītās temperatūras amplifikatoram un mikroparaugu inkubatoram norāda reakcijas temperatūru, ne vienmēr aprīkojuma iestatīto temperatūru.

Analīze

- Izvairieties no šķērspiesārņojuma.
 - Rīkojoties ar paraugiem un reaģentiem, ievērojiet pareizu laboratorijas praksi.
 - Izmantojiet jaunu vienreizlietojamo laboratorijas aprīkojumu un jaunus pipetes uzgaļus starp paraugiem un starp reaģentu ievadīšanu.
 - Izmantojiet pret aerosolu izturīgus uzgaļus, lai samazinātu savstarpējā piesārņojuma risku.
 - Izmantojiet vienvirziena darbplūsmu, pārejot no pirmsamplifikācijas uz pēc amplifikācijas zonām.
 - Vienlaicīgi rīkojieties un atveriet tikai vienu indeksēšanas praimeru. Uzreiz pēc lietošanas uzlieciet katram indeksēšanas stobriņam vāciņu. Komplektā ir iekļauti papildu vāciņi.
 - Bieži mainiet cimdus; mainiet arī tad, ja tie nonāk saskarē ar indeksēšanas praimeriem vai paraugiem.
 - Noņemiet neizmantotos indeksēšanas praimeru stobriņus no darba zonas.
 - Pēc lietošanas ar sloksnes stobriņiem, tekni vai rezervuāru, reaģentus nedrīkst novietot atpakaļ uzglabāšanas stobriņos.
 - Sajauciet paraugus ar pipeti un centrifugējiet plati, kad tas norādīts.
 - Izmantojiet mikroplates kratītāju. Nevirpiniet plates.
- Savstarpēji nemainiet analīzes komponentus no dažādām reaģentu komplektu partijām. Reaģentu komplekta partijas ir norādītas uz reaģentu komplekta kastes etiķetes un galvenās partijas lapas.
- Jāievēro pienācīga laboratorijas prakse, lai nukleāzes un PCR produkti nepiesārņotu reaģentus, instrumentus, paraugus un bibliotēkas. Nukleāzes un PCR produktu piesārņojums var izraisīt nepareizus un neuzticamus rezultātus.
- Optimālai analīzes veikspējai un uzglabāšanai ir nepieciešams pareizs plates veids. Noteikti ievērojiet plates pārvietošanas norādījumus [Lietošanas instrukcija, 38. lpp.](#)
- Neievērojot aprakstītās procedūras, rezultāti var būt kļūdaini vai var ievērojami pasliktināties bibliotēku kvalitāte.

- Ja *Lietošanas instrukcija*, 38. lpp. nav norādīts drošas apstāšanās punkts, nekavējoties pārejiet pie nākamās darbības.
- Uzglabājiet analīzes reaģentus vai komponentus norādītajā temperatūrā paredzētajās pirmsamplifikācijas un pēcamplifikācijas zonās.--
- Neuzglabājiet reaģentus uzglabāšanas iekārtā ar automātisko atkausēšanu vai ledusskapja durvju nodalījumos.
- Nesasaldējiet reaģentus, kas satur lodītes (LNB1, SPB un SMB).
- Nelietojiet reaģentus, kas ir uzglabāti nepareizi.
- Nenovirzieties no maisīšanas un apstrādes procedūrām, kas norādītas katram reaģentam. Neatbilstoša reaģentu maisīšana vai pārmērīga virpināšana var izraisīt kļūdainus paraugu rezultātus.
- FSM, SSM, ERA1-B un TCB1 var būt ar izstrādājumu saistītas daļiņas. Ievērojiet katra attiecīgā reaģenta rīkošanās vadlīnijas. Pēc FSM un SSM sajaukšanas darbību veikšanas atlikušās baltās ar izstrādājumu saistītās daļiņas neietekmēs veikspēju.
- Sagatavojiet svaigus galvenos maisījumus un pēc lietošanas izmetiet atlikušo tilpumu.
- Mazgāšanas darbībām vienmēr sagatavojiet svaigu 80 % etanolu ar RNase/DNase-free water. Etanols var absorbēt ūdeni no gaisa, kas var ietekmēt rezultātus. Pēc lietošanas izmetiet 80 % etanolu saskaņā ar vietējiem, valsts un/vai federālajiem noteikumiem.
- Pārnesiet norādīto eluāta tilpumu. Eluēšanas darbību laikā pārnesot mazāk eluāta par norādīto eluāta tilpumu, var ietekmēt rezultātus.
- Izmantojiet tālāk sniegtās vadlīnijas ultraskaņas ierīcēm. Noteikti ievērojiet ražotāja norādījumus.
 - Ievietojiet gDNS ultraskaņas ierīces stobriņā lēnām, lai izvairītos no burbuļu rašanās. Pārmērīgi burbuļi vai gaisa sprauga sadalīšanas stobriņā var izraisīt nepilnīgu fragmentāciju.
 - Veiciet ievadīšanu ultraskaņas ierīces stobriņos lēnām un izvairieties no šļakatām.
 - Lai izvairītos no šķidrums pārvietošanas un parauga zuduma, neievietojiet pipetes galu ultraskaņas ierīces stobriņa apakšā, kad izņemam fragmentēto DNS.
- Nepipējiet mazāk par 2 µl parauga ievades.
- Nelietojiet tekni reaģentu dozēšanai darbībām, kuru veikšanai katrā parauga iedobē jāpievieno mazāk nekā 10 µl materiāla.
- Pārnesot fragmentētu gDNS paraugus no utraskaņas ierīces stobriņiem uz bibliotēkas sagatavošanas (LP) plati, izmantojiet pipeti ar smalku galu.
- Nekombinējiet SUA1 un UMI adapterus.
- Izmantojiet SUA1 adapterus ar RNS paraugiem.
- Izmantojiet UMI adapterus ar DNS paraugiem.
- Piešķiriet katram bibliotēkas paraugam citus indeksēšanas praimerus, lai unikāli identificētu katru bibliotēku, kad tā ir apvienota sekvencēšanai vienā plūsmas elementā.
- Nekombinējiet CPxx un UPxx indeksēšanas praimerus vienā bibliotēkā.

- Nesakritības starp paraugiem un indeksēšanas praimeriem izraisa nepareizu rezultātu ziņošanu, jo nenotiek pozitīvo paraugu identificēšana. Ievadiet paraugu ID un piešķiriet rādītājus Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduli pirms bibliotēkas sagatavošanas sākšanas. Bibliotēkas sagatavošanas laikā atsaucei reģistrējiet paraugu ID, indeksēšanu un plates iedobju orientāciju.
- Bibliotēkām, kas iegūtas no RNS paraugiem, izmantojiet tikai UPxx rādītājus.
- Bibliotēkām, kas iegūtas no DNS paraugiem, izmantojiet UPxx rādītājus vai CPxx rādītājus.
- Sekvencējiet ne vairāk kā 8 RNS bibliotēkas un 8 DNS bibliotēkas katrā plūsmas elementā. Sekvencējiet vismaz trīs bibliotēkas. Ievērojiet vadlīnijas sadaļā [Bibliotēku skaits un rādītāju izvēle, 35. lpp.](#)
- Pēc saistīšanas darbības sadaļā [Pirmo mērķu uztveršana, 60. lpp.](#) un [Otrā mērķu uztveršana, 64. lpp.](#) nekavējoties pārejiet uz mazgāšanas darbību, lai novērstu lodīšu kapsulu izžūšanu.
- Mazgāšanas darbību laikā no iedobju apakšas izņemiet visu 80 % etilspirtu. Ir pierādīts, ka atlikušais etanols ietekmē rezultātus.
- Optimālai analīzes veikspējai ievērojiet norādīto mazgāšanas reižu skaitu, kas norādīts [Lietošanas instrukcija, 38. lpp.](#)
- Procedūras [Bibliotēku normalizēšana, 71. lpp.](#) laikā rūpīgi atkārtoti suspendējiet bibliotēku lodīšu kapsulu, lai panāktu viendabīgu klasteru blīvumu plūsmas elementā.
- Nekavējoties ziņojiet par jebkādiem nopietniem negadījumiem saistībā ar produktu uzņēmumam Illumina un to dalībvalstu kompetentajām iestādēm, kurā lietotājs un pacients ir reģistrēti.

Procedūras piezīmes

- TSO Comprehensive (EU) darbplūsmu var veikt saskaņā ar šādu grafiku.
 - 1. diena. cDNS sintēze no RNS paraugiem, gDNS paraugu DNS fragmentēšana, bibliotēkas sagatavošana un nakts (pirmās) hibridizācijas uzsākšana.
 - 2. diena. Bagātināšana, bagātināto bibliotēku normalizēšana un bibliotēku ievietošana NextSeq 550Dx instrumentā.
- Ja TSO Comprehensive (EU) darbplūsmu nav iespējams izpildīt saskaņā ar šo grafiku, protokolā viscaur tiek norādīti vairāki droši apstāšanās punkti. Ja protokolā nav norādīts drošas apstāšanās punkts, nekavējoties pārejiet pie nākamās darbības.
- Bibliotēkas, kas atvasinātas no RNS un DNS paraugiem, var sagatavot vienlaicīgi atsevišķās iedobēs.
 - Galvenā maisījuma sagatavošanas tabulās iekļauts tilpuma pārsniegums, lai nodrošinātu pietiekamu tilpumu apstrādājamo paraugu skaitam.
 - Izmantojiet molekulārās kvalitātes ūdeni, kas nesatur nukleāzes.
 - Pēc reaģenta pievienošanas izskalojiet uzgali, vienu reizi aspirējot un izvadot attiecīgajā plates iedobē, ja vien procedūrā nav norādīts citādi.
 - Istabas temperatūra tiek definēta no 15 °C līdz 30 °C.

- Reaģenti, paraugi un bibliotēkas noteiktās darbībās, kas norādītas lietošanas pamācībā, ir jāglabā aukstumā. Tas tiek definēts kā glabāšana uz ledus vai līdzvērtīga.

Amplifikatora programmas

- Pirms protokola darbību sākšanas ieprogrāmējiet amplifikatora programmas priekšamplifikācijas un pēc amplifikācijas aprīkojumam.
- Pārliedzieties, ka PCR plates ir stingri ievietojamas amplifikatorā.
- Izmantojiet amplifikatora ražotāja ieteiktās plates.

Plates noslēgšana un noslēga noņemšana

- Vienmēr noslēdziet plates ar jaunu pašlīpošo plates noslēgu. Neizmantojiet noslēgus atkārtoti.
- Lai noslēgtu plati, stingri uzlieciet uz plates pašlīpošo noslēgtu ar blīvējuma ķīli vai rullīti.
- Vienmēr noslēdziet 96 iedobju plati ar jaunu pašlīmējošo noslēgu pirms turpmākajām protokola darbībām.
 - Plates kratīšanas darbības
 - Centrifugēšanas darbības
 - Amplificēšanas darbības
 - Hibridizācija
 - Ilgtermiņa uzglabāšana
- Pārliedzieties, ka malas un iedobes ir noslēgtas, lai samazinātu savstarpējās piesārņošanas un iztvaikošanas risku.
- Nolieciet plati uz līdzenas virsmas, pirms lēnām noņemat blīvējumu.
- Ja pirms atvēršanas uz plates iedobju blīvējuma vai sānu sienām ir redzams šķidrums vai kondensāts, centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti.
- Izmantojiet pašlīpošos plašu noslēgus ar darbības diapazonu no -20 °C līdz 100 °C, kas ir piemēroti PCR platēm ar pilno vai daļējo apmali.

Aprīkojums

- Pirms analīzes sākšanas pārliedzieties, ka laboratorijas personāls ir iepazinies ar ražotāja norādījumiem par visa aprīkojuma lietošanu un apkopi.

Plates veids un plates pārvietošana

- Optimālai analīzes veikspējai un uzglabāšanai ir nepieciešams pareizs plates veids.
- Pārnesot tilpumus starp platēm, pārnesiet norādīto tilpumu no katras plates iedobes uz atbilstošo mērķa plates iedobi.
- Daudzkanālu pipetes var izmantot, lai pārnestu paraugus starp stobriņu sloksnēm vai platēm.

- Kratot plates, ievērojiet tālāk sniegtos norādījumus.
 - Plašu kratīšanai izmantojiet plašu kratītāju. Nevirpiniet plates.
 - Kratiet PCR plates ar 1200 apgr./min.
 - Kratiet MIDI plates ar 1800 apgr./min.
 - Ievērojiet ražotāja norādījumus, lai nodrošinātu, ka plates kratītājs stingri tur plati.

Centrifugēšana

- Ja protokolā sniegtie norādījumi norāda uz Īsu centrifugēšanu, centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti.
- Ja šķidrums tiek novērots uz noslēga vai iedobes sānos, centrifugējiet plati ar 280 × g 1 minūti.

Reaģentu lietošana

- Cieši uzlieciet vāciņu visiem reaģentu stobriņiem uzreiz pēc lietošanas, lai ierobežotu iztvaikošanu un novērstu piesārņojumu.
- Kad reaģenti vairs nav nepieciešami procedūrai, nolieciet tos atpakaļ norādītajā uzglabāšanas temperatūrā.
- Veiciet reaģentu sagatavošanu, kas jāizdara pirms katras *Lietošanas instrukcija*, 38. lpp. procedūras sadaļas.
- Pārliecinieties, ka sagatavojat galvenā maisījuma, eluēšanas maisījuma un 80 % etanola tilpumu, kas nepieciešams apstrādājamo paraugu skaitam.
- Tilpumi, kas norādīti galvenā maisījuma un šķīdumu tabulās, satur tilpuma pārsniegumu. Tilpuma pārsnieguma aprēķini ir šādi.
 - [14. tabula](#)
 - FSM tilpums = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{paraugu skaits} + \text{kontroles}) \times (1,25)$.
 - RVT tilpums = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{paraugu skaits} + \text{kontroles}) \times (1,25)$.
 - [21. tabula](#)
 - ERA1-B tilpums = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotēku skaits}) \times (1,20)$.
 - ERA1-A tilpums = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotēku skaits}) \times (1,20)$.
 - [29. tabula](#)
 - EE2 tilpums = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotēku skaits}) \times (1,364)$.
 - HP3 tilpums = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotēku skaits}) \times (1,364)$.
 - [30. tabula](#)
 - EE2 tilpums = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotēku skaits}) \times (1,364)$.
 - HP3 tilpums = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotēku skaits}) \times (1,364)$.
 - [36. tabula](#)
 - LNA1 tilpums = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotēku skaits}) \times (2,0)$.
 - LNB1 tilpums = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotēku skaits}) \times (2,0)$.

- [37. tabula](#)
 - EE2 tilpums = (30,4 µl) x (bibliotēku skaits) x (1,25).
 - HP3 tilpums = (1,6 µl) x (bibliotēku skaits) x (1,25).

Adapteru komplekti

- TSO Comprehensive (EU) analīze ietver SUA1 adapterus un UMI adapterus.
- SUA1 adapteri ir paredzēti lietošanai ar RNS paraugiem. Nav paredzēti lietošanai ar DNS paraugiem.
- UMI adapteri ir paredzēti lietošanai ar DNS paraugiem. Nav paredzēti lietošanai ar RNS paraugiem.

Rīkošanās ar lodītēm

- TSO Comprehensive (EU) analīzē ir iekļauti trīs lodīšu veidi (SPB, SMB un LNB1). Pārliecinieties, ka procedūras laikā tiek izmantots pareizais lodīšu veids.
- Veiciet pareizo mazgāšanas reižu skaitu katram lodīšu veidam.
- Pirms lietošanas pārliecinieties, ka lodītes ir istabas temperatūrā.
- Pirms lietošanas 1 minūti maisiet lodītes, lai nodrošinātu viendabīgumu.
- Maisot lodītes ar pipeti, ievērojiet tālāk sniegtos norādījumus.
 - Izmantojiet maisījuma tilpumam piemērota izmēra pipeti un uzgali.
 - Pielāgojiet tilpuma iestatījumu uz aptuveni 50–75 % no parauga tilpuma.
 - Pipetējiet lēnām, neatlaižot virzuli.
 - Izvairieties no šļakatām un burbuļu ievadīšanas.
 - Novietojiet pipetes galu virs kapsulas un izspiediet tieši kapsulā, lai atbrīvotu lodītes no iedobes vai stobriņa.
 - Nodrošiniet, ka lodīšu kapsula pilnībā atrodas šķīdumā. Šķīdumam vajadzētu izskatīties tumši brūnam, un tam jābūt viendabīgai konsistencei.
 - Novērtējiet, vai ir redzama lodīšu kapsula. Rūpīgi aspirējiet visu iedobes lodīšu šķīdumu uzgalī un apskatiet iedobes apakšdaļu.
- Ja lodītes tiek aspirētas pipetes galos magnētiskās separēšanas darbību laikā, izspiediet lodītes atpakaļ plates iedobē magnētiskajā statīvā. Pagaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (aptuveni 2 minūtes), pirms pārejat uz nākamo procedūras soli.
- Mazgājot lodītes, ievērojiet tālāk sniegtos norādījumus.
 - Izmantojiet platei piemērotu magnētisko statīvu.
 - Izspiediet šķidrumu tieši uz lodīšu kapsulas tā, lai iedobes sānos esošās lodītes tiktu samitrinātas.
 - Turiet plati uz magnētiskā statīva, līdz procedūrā norādīts to noņemt.
 - Nekratiet plati, kamēr tā atrodas uz magnētiskā statīva.
 - Neaiztieciet lodīšu kapsulu, kamēr plate atrodas uz magnētiskā statīva.

- Mazgājot lodītes vai noņemot virskārtu, novietojiet pipetes uzgaļus iedobju apakšā leņķī, lai izvairītos no vakuuma radīšanas un šķīduma ieraušanas pipetes uzgaļa filtros.

Bibliotēku skaits un rādītāju izvēle

Pirms izpildes iestatīšanas plānojiet paraugu bibliotēku un paraugu rādītāju skaitu sekvencēšanas izpildei. Tālāk sniegtajās paraugu skaita vadlīnijās ir iekļautas pozitīvās kontroles, bet nav iekļautas negatīvās kontroles/kontroles bez veidnes (NTC). NTC ir jāpievieno plānotajai izpildei kā papildu paraugs.

Attiecībā uz TSO Comprehensive (EU) skatiet vadlīnijas [6. tabula](#) un [7. tabula](#), lai noteiktu sekvencējamo RNS un/vai DNS bibliotēku skaitu vienā plūsmas elementā. Skatiet [6. tabula](#), ja sekvencējat RNS vai DNS bibliotēkas atsevišķi. Skatiet [7. tabula](#), ja sekvencējat RNS un DNS bibliotēkas vienā un tajā pašā plūsmas elementā.

6. tabula RNS vai DNS bibliotēku sekvencēšana

Bibliotēkas tips	Minimālais*	Maksimālais*
Tikai RNS	3	16
Tikai DNS	3	8

* NTC neveicina pleksitāti.

7. tabula RNS un DNS bibliotēku sekvencēšana vienā un tajā pašā plūsmas elementā

Bibliotēkas tips	Minimālais*	Maksimālais*
RNS	3	8
DNS	3	8

* NTC neveicina pleksitāti.

Optimālai reaģenta lietošanai, veicot DNS un RNS sekvencēšanu ar TSO Comprehensive (EU)NextSeq 550Dx instrumentu ierīcē, sekvencējiet 8 RNS bibliotēkas un 8 DNS bibliotēkas katrā plūsmas elementā.

Indeksēšanas praimeru unikāli identificē katru paraugu, lai bibliotēkas varētu apvienot sekvencēšanai vienā plūsmas elementā. Saderīgas indeksēšanas kombinācijas tiek parādītas ekrānā Create Run (Izveidot izpildi), iestatot izpildi programmatūrā Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes modulī. Bibliotēkas sagatavošanas laikā pievienojiet indeksēšanas praimeru katrai parauga bibliotēkai. *Katrai paraugu bibliotēkai izmantojiet atšķirīgu indeksēšanas praimeru maisījumu.*

Pārliecinieties, ka indeksēšanas praimeru, ko izmantojat ar paraugiem, atbilst rādītājiem, ko izvēlaties analīzei ar Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes modulī. *Nesakrītības izraisa nepareizu rezultātu ziņošanu, jo nenotiek pozitīvo paraugu identificēšana.*

TSO Comprehensive (EU) analīzē ir divu veidu rādītāji.

- UPxx rādītāji** — izmantojiet UPxx rādītājus bibliotēkām, kas iegūtas no RNS vai DNS paraugiem.

- **CPxx rādītāji** — izmantojiet CPxx rādītājus bibliotēkām, kas iegūtas no DNS paraugiem. Neizmantojiet CPxx rādītājus bibliotēkām, kas iegūtas no RNS vai kopā sekvencējot tikai trīs DNS bibliotēkas.

Sekvēncējot tikai trīs bibliotēkas, attiecināmas turpmāk norādītās prasības.

- Bibliotēkām jābūt ar visām DNS vai visām RNS.
- Nelietojiet CPxx rādītāju komplektus.
- Lai nodrošinātu pietiekamu daudzveidību, ir nepieciešams viens no tālāk norādītajām UPxx rādītāju komplektiem.
 - UP01, UP02 un UP03
 - UP04, UP05 un UP06
 - UP07, UP08 un UP09
 - UP10, UP11 un UP12

Piemēram, pirmajai bibliotēkai tiek piešķirts UP01, otrajai bibliotēkai UP02 un trešajai bibliotēkai UP03.

TruSight Oncology Controls

TSO Comprehensive (EU) nepieciešams TruSight Oncology Controls, kas sastāv no TruSight Oncology DNS kontroles un TruSight Oncology RNS kontroles kā pozitīvām kontrolēm. Iekļaujiet TruSight Oncology DNS kontroli katrai DNS sekvencēšanas izpildei un TruSight Oncology RNS kontroli katrai RNS sekvencēšanas izpildei attiecīgās bibliotēkas sagatavošanas notikumā (ietveriet kontroles arī kombinētajām DNS un RNS izpildēm). Katrai plānotajai sekvencētajai izpildei tiek sagatavota unikāla pozitīvā kontrole. Skatiet TruSight Oncology Controls lietošanas instrukciju (dokuments Nr. 200009919), lai saņemtu papildinformāciju.

Pozitīvās kontroles ievades apjoms DNS un RNS gadījumā ir 40 ng.

Katrā RNS un katrā DNS bibliotēkas sagatavošanas notikumā iekļaujiet vienu piemērotu NTC. NTC tiek atkārtoti sekvencēti vienā bibliotēkas sagatavošanas notikumā. Ievērojiet šīs vadlīnijas attiecībā uz TruSight Oncology Controls.

- Sagatavojiet bibliotēkas no pozitīvām kontrolēm un kontrolēm bez veidnes, kas ir identiskas paraugiem.
- Izmantojiet TEB, kas paredzēts DNS NTC.
- RNS NTC izmantojiet ūdeni, kas nesatur DNāzi/RNāzi.
- Pozitīvās kontroles ir iekļautas maksimālajā bibliotēkas prasībā.
- NTC nav iekļautas minimālajā bibliotēkas prasībā.
- Izmantojiet UP rādītājus NTC, veicot tikai 3 bibliotēku sekvencēšanu.
- Tā kā NTC tiek sekvencēti atkārtoti, šai kontrolei atlasītos rādītājus nevar atkārtot bibliotēkas sagatavošanas notikumā.

Tālāk tabulās ir parādīti plašu izkārtojumu piemēri bibliotēkas sagatavošanai. Katra numurētā kolonna attēlo vienu sekvencēšanas izpildi. Veicot DNS un RNS bibliotēku sekvencēšanu kopā, katrā atbilstošā sleju kopa attēlo vienu sekvencēšanas izpildi (piemēram, 1. sleja un 7. sleja). NTC tiek sekvencēta katrai slejai vai sleju kopai.

8. tabula Bibliotēkas sagatavošanas notikums vienai izpildei, kas ietver sešus pacientu paraugus

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pozitīva DNS kontrolē	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	Pozitīva RNS kontrolē
B	1. DNS	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	1. RNS
C	2. DNS	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	2. RNS
D	3. DNS	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	3. RNS
E	4. DNS	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	4. RNS
F	5. DNS	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	5. RNS
G	6. DNS	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	6. RNS
H	DNS NTC	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	tukšs	RNS NTC

9. tabula Bibliotēkas sagatavošanas notikums trīs izpildēm, kas ietver 20 pacientu paraugus

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pozitīva DNS kontrolē	Pozitīva DNS kontrolē	Pozitīva DNS kontrolē	tukšs	Pozitīva RNS kontrolē	Pozitīva RNS kontrolē	Pozitīva RNS kontrolē
B	1. DNS	7. DNS	14. DNS	tukšs	1. RNS	7. RNS	14. RNS
C	2. DNS	8. DNS	15. DNS	tukšs	2. RNS	8. RNS	15. RNS
D	3. DNS	9. DNS	16. DNS	tukšs	3. RNS	9. RNS	16. RNS
E	4. DNS	10. DNS	17. DNS	tukšs	4. RNS	10. RNS	17. RNS
F	5. DNS	11. DNS	18. DNS	tukšs	5. RNS	11. RNS	18. RNS
G	6. DNS	12. DNS	19. DNS	tukšs	6. RNS	12. RNS	19. RNS
H	DNS NTC	13. DNS	20. DNS	tukšs	RNS NTC	13. RNS	20. RNS

Lietošanas instrukcija

TSO Comprehensive (EU) darbplūsmas pārskats ir parādīts [1. attēls](#) un [2. attēls](#).

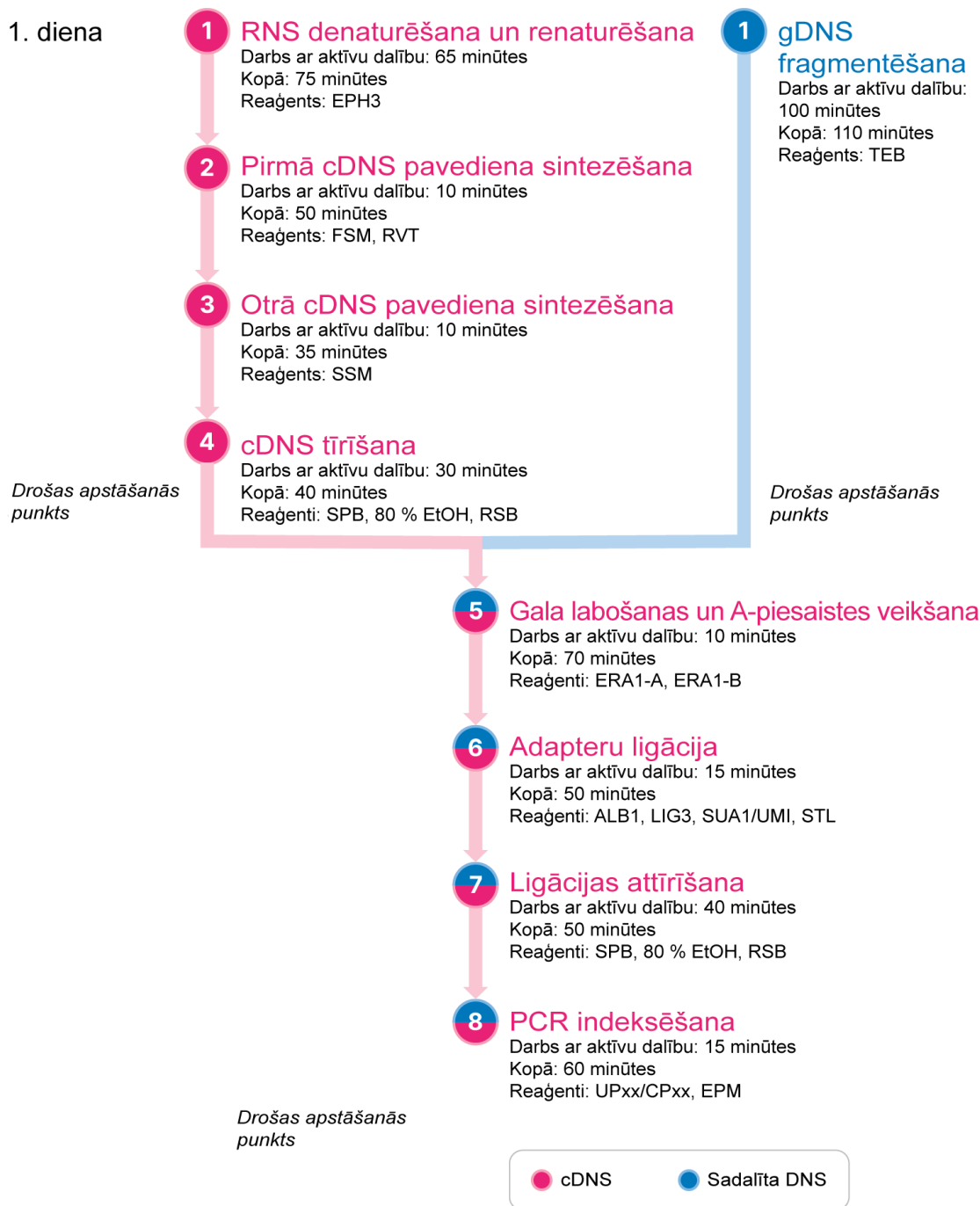
Bibliotēkas sagatavošanas darbplūsma

[1. attēls](#) parādīta bibliotēkas sagatavošanas darbplūsma ar TSO Comprehensive (EU). Bibliotēkas no RNS un DNS paraugiem var sagatavot vienlaicīgi atsevišķās iedobēs. Pozitīvās kontroles un kontroles bez veidnēm tiek apstrādātas tāpat kā paraugi. Starp darbībām ir atzīmēti drošas apstāšanās punkti.

Pirms protokola izpildes sākšanas Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes modulī programmatūrā ievadiet izpildes un parauga informāciju. Skatiet *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedi (dokuments Nr. 200008661)*.

1. attēls TSO Comprehensive (EU) darbplūsmas (1. daļa)

1. diena

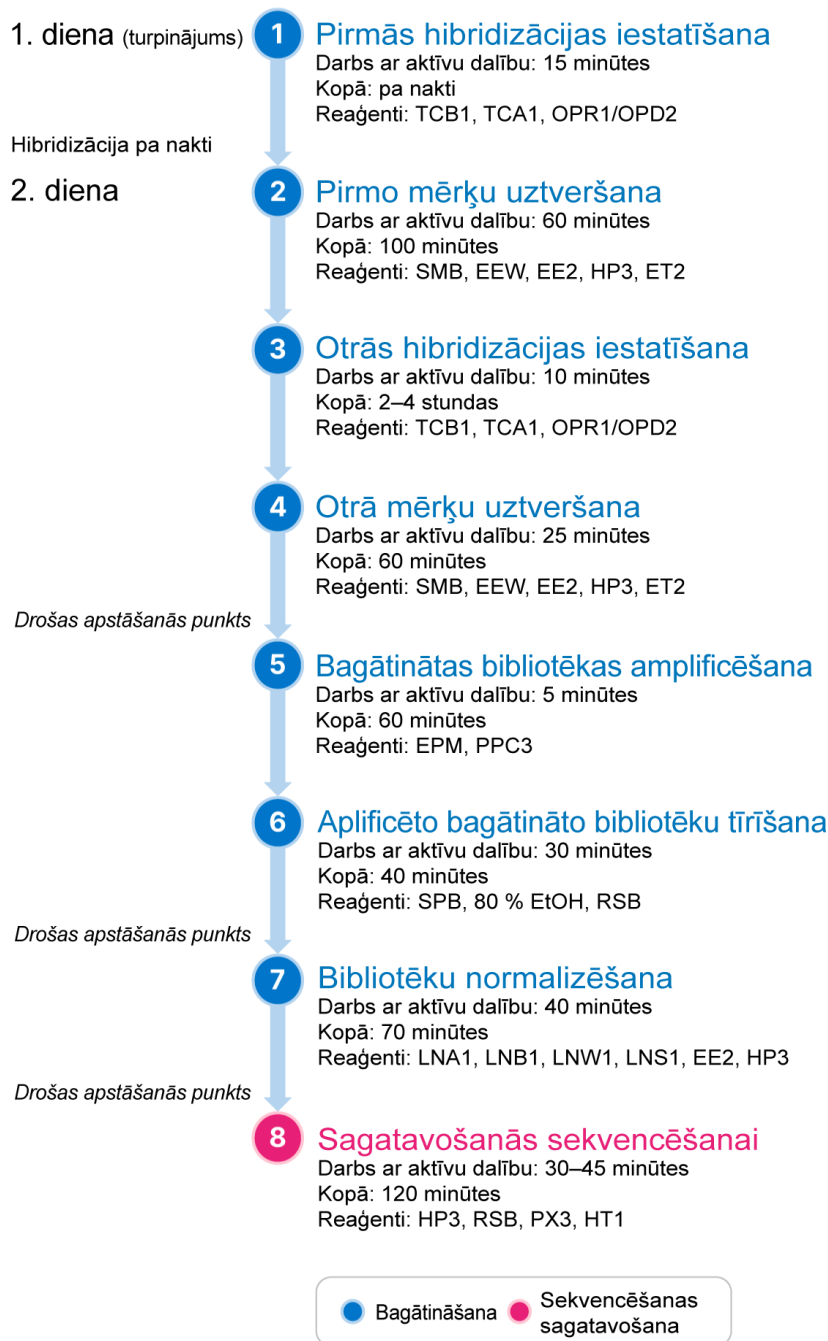


* Laiks darbam ar aktīvu dalību un kopējais darba laiks ir aptuvenš.

Bagātināšanas darbplūsmas

2. attēls parādīta TSO Comprehensive (EU) bagātināšanas darbplūsmas. Starp darbībām ir atzīmēti drošas apstāšanās punkti.

2. attēls TSO Comprehensive (EU) darbplūsmas (2. daļa)



Amplifikatoru programmēšana

Pirms analīzes sākšanas saglabājiet tālāk norādītās programmas pirmsamplifikācijas un pēcamplifikācijas amplifikatoros.

10. tabula Pirmsamplifikācijas amplifikatora programmas

Procedūras darbība	Programmas nosaukums	Vāka temperatūra	Reakcijas tilpums	Amplifikatora parametri
RNS denaturēšana un renaturēšana	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C uz 5 minūtēm • 4 °C uz 1 minūti • Turēt 4 °C temperatūrā
Pirmā cDNS pavediena sintezēšana	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C uz 10 minūtēm • 42 °C uz 15 minūtēm • 70 °C uz 15 minūtēm • 4 °C uz 1 minūti • Turēt 4 °C temperatūrā
Otrā cDNS pavediena sintezēšana	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C uz 25 minūtēm • 4 °C uz 1 minūti • Turēt 4 °C temperatūrā

PIEZĪME

Ja vāka temperatūru programmā 2ndSS nevar iestatīt uz 30 °C, izslēdziet iepriekš sakarsētā vāka sildīšanas opciju.

11. tabula Pēcamplifikācijas amplifikatora programmas

Procedūras darbība	Programmas nosaukums	Vāka temperatūra	Reakcijas tilpums	Amplifikatora parametri
PCR indeksēšana	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C uz 30 sekundēm • 15 cikli: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C uz 10 sekundēm • 60 °C uz 30 sekundēm • 72 °C uz 30 sekundēm • 72 °C uz 5 minūtēm • Turēt 10 °C temperatūrā

Procedūras darbība	Programmas nosaukums	Vāka temperatūra	Reakcijas tilpums	Amplifikatora parametri
Pirmās hibridizācijas veikšana	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C uz 10 minūtēm • 85 °C uz 2 minūtēm un 30 sekundēm • 75 °C uz 2 minūtēm un 30 sekundēm • 65 °C uz 2 minūtēm un 30 sekundēm • Turiet 57 °C temperatūrā no 8 līdz 24 stundām
Otrās hibridizācijas veikšana	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C uz 10 minūtēm • 85 °C uz 2 minūtēm un 30 sekundēm • 75 °C uz 2 minūtēm un 30 sekundēm • 65 °C uz 2 minūtēm un 30 sekundēm • Turiet 57 °C temperatūrā no 1,5 līdz 4 stundām
Bagātinātas bibliotēkas amplificēšana	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C uz 30 s • 18 cikli: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C uz 10 s • 60 °C uz 30 s • 72 °C uz 30 s • 72 °C uz 5 minūtēm • Turēt 10 °C temperatūrā

Sagatavošanās protokolam

Šī sagatavošana ir nepieciešama, lai veiktu protokola darbības, kas aizved līdz nākamajam drošajam apstāšanās punktam.



UZMANĪBU!

Visām darbplūsmas procedūrām ir nepieciešama vide, kurā nav RNāzes/DNāzes.

1. Rūpīgi attīriet darba zonas ar RNāzi/DNāzi inhibējošu tīrīšanas līdzekli.
2. Pārbaudiet, ka ir iestatītas pirmsamplifikācijas amplifikatora programmas. Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#)
3. Izpildiet ražotāja norādījumus, lai iestatītu ultraskaņas ierīci.
4. Ja tiek apstrādāti tikai DNS paraugi, turpiniet uzreiz ar darbību [gDNS fragmentēšana, 48. lpp.](#)

5. Izņemiet RNS kontroles no glabāšanas vietas.
6. Izņemiet reaģentu stobriņus no kastes un izpildiet atkausēšanas norādījumus.

12. tabula TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (PN 20031127)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
EPH3	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	RNS denaturēšana un renaturēšana
FSM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Pirmā cDNS pavediena sintezēšana
RVT	No -25 °C līdz -15 °C	Uzglabāt aukstu.	Pirmā cDNS pavediena sintezēšana
SSM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Otrā cDNS pavediena sintezēšana

13. tabula TruSight Oncology Comp Library Prep (Atdzesēts) (PN 20031119)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
SPB (gaiši zaļa etiķete)	No 2 °C līdz 8 °C	Noturiet istabas temperatūrā 30 minūtes.	cDNS tīrīšana
RSB	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	cDNS tīrīšana

RNS denaturēšana un renaturēšana

Šis process denaturē attīrītu RNS un papildina ar nejaušiem heksamēriem, gatavojoties cDNS sintēzei.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - EPH3 — nolieciet malā.
 - FSM — virpiniet, lai samaisītu. Nedaudz centrifugējiet un pēc tam pipetējiet, lai samaisītu. Reaģents var saturēt baltas ar produktu saistītas daļiņas. Nav nepieciešama lietotāja darbība. Nav ietekmes uz izstrādājuma veiktspēju.
 - RTV — nedaudz centrifugējiet un pēc tam pipetējiet, lai samaisītu. Uzglabāt aukstu.

PIEZĪME RVT ir viskozs šķīdums. Pipetēšanas laikā samaziniet burbuļu veidošanos.

2. Mikrocentrifūgas stobriņā apvienojiet tālāk norādītos tilpumus, lai sagatavotu FSM+RVT galveno maisījumu.

14. tabula FSM + RVT galvenais maisījums*

Galvenā maisījuma sastāvdaļa	4 bibliotēkas (µl)	8 bibliotēkas (µl)	16 bibliotēkas (µl)	24 bibliotēkas (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Šajā tabulā ir iekļauts tilpuma pārsniegums. Aprēķinus skatiet sadaļā [Reaģentu lietošana, 33. lpp.](#)

- Pipetējiet 10 reizes, lai samaisītu.
- Turiet FSM+RVT galveno maisījumu aukstumā līdz darbībai [Pirmā cDNS pavediena sintezēšana, 44. lpp.](#)

Procedūra

- Atkausēšanas laikā turiet ekstrahētos RNS paraugus un RNS kontroles aukstumā. Atlikušajā protokola daļā apstrādājiet RNS kontroles tāpat kā paraugus.
- Kad RNS netiek lietota, turiet to aukstumā. Lai kvantificētu paraugus, skatiet [Paraugu prasības, 26. lpp.](#)
- Pipetējiet katru RNS paraugu 10 reizes, lai samaisītu.
- Izmantojiet RNase/DNase-free water, lai sagatavotu 40 ng katra RNS parauga galīgajā tilpumā 8,5 µl (4,7 ng/µl).
RNS kontrolēm izmantojiet koncentrāciju, kas norādīta uz stobriņa etiķetes.
- Marķējiet jaunu 96 iedobju PCR plati kā CF (cDNS fragmenti).
- Pievienojiet 8,5 µl katra RNS parauga unikālai CF PCR plates iedobei.
- Pārliecinieties, ka paraugu plates izkārtojums un rādītāji katram paraugam atbilst izpildei, kas plānota TSO Comprehensive (EU) analīzes modulis izpildes iestatīšanas laikā.
- Virpiniet EPH3, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
- Pievienojiet 8,5 µl EPH3 katrai parauga iedobei.
- Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz CF PCR plates.



UZMANĪBU!

Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.

- Kratiet ar 1200 apgr./min 1 minūti.
- Centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti.
- Novietojiet uz amplifikatora un palaidiet LQ-RNA programmu.
Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#)
- Kad paraugi sasniedz 4 °C, turiet 1 minūti. Nekavējoties veiciet nākamo darbību.

Pirmā cDNS pavediena sintezēšana

Šis process veic reverso transkripciju RNS fragmentiem, kas papildināti ar nejaušiem heksamēriem, pirmā pavediena cDNS, izmantojot reverse transcriptase.

Procedūra

1. Noņemiet CF PCR plati no amplifikatora.
2. Pipetējiet 10 reizes, lai samaisītu FSM + RVT galveno maisījumu. Nodrošini, ka FSM + RVT maisījums ir pilnīgi viendabīgs.
3. Pievienojiet 8 µl FSM + RVT galvenā maisījuma katrai parauga iedobei.
4. Pipetējiet 10 reizes, lai samaisītu.
5. Izmetiet atlikušo FSM + RVT galveno maisījumu.
6. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz CF PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
7. Kratiet ar 1200 apgr./min 1 minūti.
8. Centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti.
9. Novietojiet uz amplifikatora un palaidiet 1stSS programmu.
Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#).
10. Kad paraugi sasniedz 4 °C, nekavējoties pārejiet pie nākamās darbības.
Pirmā pavediena paraugus var turēt 4 °C temperatūrā līdz 5 minūtēm.

Otrā cDNS pavediena sintezēšana

Šis process noņem RNS veidni un sintezē divu pavedienu cDNS.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet SSM.
 - a. Apvērsiet 10 reizes, lai samaisītu.
 - b. Centrifugējiet īsu brīdi. Reaģents var saturēt baltas ar produktu saistītas daļiņas. Nav nepieciešama darbība. Nav ietekmes uz izstrādājuma veiktspēju.

Procedūra

1. Noņemiet CF PCR plati no amplifikatora.
2. Pievienojiet 25 µl SSM katrai parauga iedobei.
3. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz CF PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
4. Kratiet ar 1200 apgr./min 1 minūti.
5. Centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti.
6. Novietojiet uz amplifikatora un palaidiet 2ndSS programmu.
Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#).
7. Kad paraugi sasniedz 4 °C, turiet 1 minūti, tad nekavējoties pārejiet pie nākamās darbības.

cDNS tīrīšana

Šajā procesā izmanto SPB, lai attīrītu cDNS no nevēlamiem reakcijas komponentiem. Lodītes mazgā divreiz ar svaigu 80 % EtOH. cDNS tiek eluēta ar RSB.

Sagatavošana

- Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - SPB — nodrošiniet, ka lodītes atrodas istabas temperatūrā 30 minūtes.
 - RSB — nolieciet malā lietošanai procedūrā.
- Sagatavojiet svaigu 80 % etilspirtu 15 ml vai 50 ml konusveida stobriņā, kā norādīts tālāk.

15. tabula Sagatavojiet svaigu 80 % EtOH.

Reaģents	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas
100 % EtOH, tīrs	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- Virpiniet svaigu 80 % EtOH, lai samaisītu.
- Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā BIND1 (cDNS saistīšana).
- Pārklājiet un nolieciet malā.
- Uzstādiet magnētu.

Procedūra

Saistīšana

- Noņemiet CF PCR plati no amplifikatora.
- Virpiniet SPB 1 minūti, lai atkārtoti suspendētu lodītes.
- Nekavējoties pievienojiet 90 µl SPB katrai BIND1 MIDI plates parauga iedobei.
Ja SPB dozēšanai tiek izmantota tekne, alikvotējot pietiekamu materiāla daudzumu katram paraugam, iekļaujiet tilpuma pārsniegumu ar koeficientu 1,15. Izmetiet atlikušo materiālu pēc tam, kad SPB ir pievienots katrai parauga iedobei.
- Pārnesiet visu tilpumu (50 µl) no katras CF PCR plates iedobes uz atbilstošu BIND1 MIDI plates iedobi.
- Izmetiet tukšo CF PCR plati.
- Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz BIND1 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
- Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
- Inkubējiet istabas temperatūrā 5 minūtes.
- Novietojiet BIND1 MIDI plati uz magnētiskā statīva uz 5 minūtēm.

10. Turiet plati uz magnētiskā statīva. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.

Mazgāšana

1. Mazgājiet lodītes, kā aprakstīts tālāk.
 - a. Turiet BIND1 MIDI plati uz magnētiskā statīva un pievienojiet 200 µl svaiga 80 % EtOH katrā iedobē.
 - b. Uzgaidiet 30 sekundes.
 - c. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.
2. Mazgājiet lodītes **otrrreiz**.
3. Izmantojiet pipeti ar smalkiem uzgajiem, lai no katras iedobes izņemtu atlikušo EtOH.
4. Izmetiet neizmantoto 80 % EtOH.

Eluēšana

1. Noņemiet BIND1 MIDI plati no magnētiskā statīva.
2. Apgrieziet otrādi vai virpiniet RSB, lai samaisītu.
3. Pievienojiet 22 µl RSB katrai parauga iedobei.
4. Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz BIND1 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
5. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
6. Inkubējiet istabas temperatūrā 2 minūtes.
7. Novietojiet uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
8. Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā PCF (Attīrīti cDNS fragmenti).
Ja pārtraucat darbu pie [DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS, 47. lpp.](#), izmantojiet PCR plati.
9. Pārnesiet 20 µl eluāta no katras BIND1 MIDI plates parauga iedobes uz atbilstošu PCF plates iedobi.
10. Izmetiet tukšo BIND1 MIDI plati.
11. Pievienojiet 30 µl RSB katrā PCF plates parauga iedobē.
12. Pipetējiet 10 reizes, lai samaisītu.
13. Uzlieciet pašlipošo plates noslēgu uz PCF plates un turiet to atdzesētu.
14. Novietojiet EPH3, FSM, RVT un SSM atpakaļ glabāšanas vietā.
15. Ja jūs apstrādājat paraugus, kas iegūti tikai no RNS (cDNS), un nepārtraucat darbu drošas apstāšanās punktā, turpiniet ar darbību [Gala labošanas un A-piesaistes veikšana, 51. lpp.](#),

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, centrifugējiet PCF PCR plati ar 280 × g 1 minūti un uzglabājiet no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 7 dienām.

Sagatavošanās protokolam

Šī sagatavošana ir nepieciešama, lai veiktu protokola darbības, kas aizved līdz nākamajam drošajam apstāšanās punktam.

1. Izņemiet DNS kontroles no glabāšanas vietas.
2. Izņemiet reaģentu stobriņu no kastes un izpildiet atkausēšanas norādījumus.

16. tabula TruSight Oncology Comp Library Prep (Atdzesēts) (PN 20031119)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
TEB	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	gDNS fragmentēšana

gDNS fragmentēšana

Šis process fragmentē gDNS un ģenerē dsDNS fragmentus ar 3' vai 5' uzlaidēm.

Sagatavošana

1. Lai kvantificētu paraugus, ievērojiet ieteikumus sadaļā [Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana, 27. lpp.](#)
2. Sagatavojiet TEB — apgrieziet otrādi vai virpiniet, lai samaisītu.

Procedūra

Plates sagatavošana

Izvēlieties vienu no tālāk norādītajām iespējām, lai sagatavotu plati.

- Apstrādājiet gDNS paraugus vienlaicīgi ar cDNS paraugiem PCF MIDI platē.
 - a. Marķējiet PCF MIDI plati kā LP (Bibliotēku sagatavošana).
 - b. Glabājiet aukstumā un nolieciet malā izmantošanai darbībā [Fragmentētās DNS pārvešana, 49. lpp.](#)
- Apstrādājiet gDNS paraugus vienlaicīgi ar cDNS paraugiem, un PCF PCR plate ir sasaldēta.
 - a. Atkausējiet PCF PCR plati līdz istabas temperatūrai.
 - b. Centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti.
 - c. Pipetējiet 10 reizes, lai samaisītu.
 - d. Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā LP (Bibliotēku sagatavošana).
 - e. Pārnēsiet visus 50 µl katra parauga no PCF PCR plates uz atbilstošo LP MIDI plates iedobi.
 - f. Izmetiet PCF PCR plati.
 - g. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu un glabājiet aukstumā līdz darbībai [Fragmentētās DNS pārvešana, 49. lpp.](#)

- Apstrādājiet tikai gDNS paraugus.
 - a. Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā LP (Bibliotēku sagatavošana).
Ja pārtraucat darbu pie [DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS, 50. lpp.](#), izmantojiet PCR plati.
 - b. Pārklājiet un nolieciet malā izmantošanai darbībā [Fragmentētās DNS pārvešana, 49. lpp.](#)

Atšķaidiet gDNS

1. Atkausējiet gDNS paraugus un DNS kontroles istabas temperatūrā.
2. Pipetējiet katru gDNS paraugu 10 reizes, lai samaisītu.
3. Centrifugējiet stobriņu uz īsu brīdi, lai savāktu pilienus.
4. Apgrieziet otrādi vai virpiniet TEB, lai samaisītu.
5. Izmantojiet TEB, lai sagatavotu katru gDNS paraugu galīgajā tilpumā 52 µl. Skatiet tālāk tabulā ievades daudzumus un minimālās koncentrācijas, pamatojoties uz parauga veidu.
 - Analīzei nepieciešama minimālā ekstrakcijas koncentrācija, lai nodrošinātu vismaz 40 µl TEB 52 µl tilpumā.
 - DNS kontrolēm izmantojiet koncentrāciju, kas norādīta uz stobriņa etiķetes.
 - Lai novērstu parauga zudumu, nepipetējiet šajā atšķaidījumā mazāk par 2 µl parauga.

Parauga veids	Ievades daudzums (ng)	Minimālā koncentrācija (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrole	40	Skatiet stobriņa etiķeti

Fragmentējiet

1. Pievienojiet 52 µl katra gDNS parauga atsevišķā ultraskaņas ierīces stobriņa iedobē.



UZMANĪBU!

Lēni ievietojiet gDNS stobriņā, pārliecinoties, ka stobriņa apakšā nav gaisa spraugu. Papildinformāciju skatiet sadaļā [Analīze, 29. lpp.](#) un ražotāja norādījumos.

2. Reģistrējiet sloksnes orientāciju.
3. Fragmentējiet gDNS fragmentos ar ultraskaņas ierīci.

Fragmentētās DNS pārvešana

1. Pārliecinieties, ka katra parauga plates izkārtējums un rādītāji atbilst izpildei, kuru izvēlējāties analizēšanai ar TSO Comprehensive (EU) analīzes moduļi.
2. Izpildiet ultraskaņas ierīces ražotāja norādījumus, lai reģenerētu paraugu.
Dažiem ultraskaņas ierīces stobriņu veidiem ir nepieciešama centrifugēšana, lai konsolidētu paraugu stobriņā.

- Katram fragmentētās gDNS paraugam izmantojiet pipeti ar smalku uzgali, lai veiktu trīs 16,7 µl pārnesanas uz LP MIDI plates tukšu iedobi.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz LP MIDI plates.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, uzklājiet pašlīmējošo plates noslēgu uz LP PCR plates un centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti. Uzglabājiet no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 7 dienām.

Sagatavošanās protokolam

Šī sagatavošana ir nepieciešama, lai veiktu protokola darbības, kas aizved līdz nākamajam drošajam apstāšanās punktam.

Pārliecinieties, ka ir iestatītas pēcamplifikācijas amplifikatora programmas. Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#)

- Sagatavojiet ledus spaini vai tam līdzvērtīgu.
- Izņemiet reaģentu stobriņus no kastes un izpildiet atkausēšanas norādījumus.

17. tabula TruSight Oncology Comp Library Prep (Sasaldēts), kaste (PN 20031118)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
ERA1-A	No -25 °C līdz -15 °C	Uzglabāt aukstu.	Gala labošanas un A-piesaistes veikšana
ERA1-B	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Gala labošanas un A-piesaistes veikšana
ALB1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Adapteru ligācija
LIG3	No -25 °C līdz -15 °C	Uzglabāt aukstu.	Adapteru ligācija
SUA1 (zils vāciņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Adapteru ligācija
UMI (balts vāciņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Adapteru ligācija
STL	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Adapteru ligācija
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Uzglabāt aukstu.	PCR indeksēšana

18. tabula TruSight Oncology Comp Library Prep (Atzesēts), kaste (PN 20031119)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
SPB (gaiši zaļa etiķete)	No 2 °C līdz 8 °C	Noturiet istabas temperatūrā 30 minūtes.	Ligācijas attīrīšana
RSB	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Ligācijas attīrīšana

19. tabula TruSight Oncology Comp UP Index Primers, kaste (PN 20031120)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
UPxx	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet atbilstošos indeksēšanas praimeru stobriņus līdz istabas temperatūrai.	PCR indeksēšana

20. tabula TruSight Oncology Comp CP Index Primers, kaste (PN 20031126)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
CPxx	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet atbilstošos indeksēšanas praimeru stobriņus līdz istabas temperatūrai.	PCR indeksēšana

Gala labošanas un A-piesaistes veikšana

Šis process salabo pārļaides, kas fragmentēšanas rezultātā rodas galos ar A-piesaistes pārļaidi, izmantojot End Repair A-Tailing galveno maisījumu (ERA1).

Šī maisījuma 3'–5' eksonukleāzes aktivitāte noņem 3' pārļaides, un 5'–3' polimerāzes aktivitāte aizpilda 5' pārļaides. Šīs reakcijas laikā 3' galiem tiek pievienota A-piesaiste, lai novērstu to sasaisti savā starpā adaptera ligācijas reakcijas laikā.

Sagatavošana

- Iepriekš uzsildiet 2 mikroparaugu inkubatorus ar MIDI sildīšanas bloku ieliktņiem, kā norādīts tālāk.
 - Uzsildiet mikroparaugu inkubatoru līdz 30 °C.
 - Uzsildiet mikroparaugu inkubatoru līdz 72 °C.
- Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - ERA1-A — nedaudz centrifugējiet un pēc tam pipetējiet, lai samaisītu. Uzglabāt aukstu.
 - ERA1-B — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet. Pārbaudiet, vai nav nogulšņu. Ja ir, sasildiet stobriņu līdz 37 °C un pēc tam pipetējiet, lai samaisītu, līdz nogulsnes izšķīst.

3. Sagatavojiet ERA1 galveno maisījumu mikrocentrifūgas stobriņā.

21. tabula ERA1 galvenais maisījums*

Galvenā maisījuma sastāvdaļa	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas	48 bibliotēkas
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

* Šajā tabulā ir iekļauts tilpuma pārsniegums. Aprēķinus skatiet sadaļā [Reaģentu lietošana, 33. lpp.](#)

4. Lēni pipetējiet 10 reizes, un pēc tam nedaudz centrifugējiet. Glabājiet ERA1 galveno maisījumu aukstumā.
5. Lai sagatavotu plati, izvēlieties vienu no tālāk norādītajām iespējām.
- Ja paraugi atrodas MIDI platē, sagatavojiet tos šādi.
 - a. Pārmarķējiet MIDI plati kā LP2 (Bibliotēku sagatavošana 2).
 - b. Ja daži paraugi atrodas atsevišķās MIDI platēs, pārvietojiet visus paraugus uz atsevišķām iedobēm vienā MIDI platē atbilstoši plates izkārtojumam.
 - Ja plate ir sasalusi, sagatavojiet to šādi.
 - a. Atkausējiet PCF PCR plati vai LP PCR plati līdz istabas temperatūrai.
 - b. Centrifugējiet plati ar spēku 280 × g 1 minūti.
 - c. Pipetējiet 10 reizes, lai samaisītu.
 - d. Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā LP2 (Bibliotēku sagatavošana 2).
 - e. Pārnēsiet visus 50 µl katra parauga no PCF PCR plates vai LP PCR plates uz atbilstošo LP2 MIDI plates iedobi.
 - f. Izmetiet PCF PCR vai LP PCR plati.

Procedūra

1. Pievienojiet 10 µl ERA1 galvenā maisījuma katrā parauga iedobē LP2 MIDI platē.
2. Izmetiet atlikušo ERA1 galveno maisījumu.
3. Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz LP2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
4. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
5. Inkubējiet iepriekš uzsildītā mikroparaugu inkubatorā 30 °C temperatūrā 30 minūtes.
6. Nekavējoties pārnēsiet uz otru, iepriekš uzsildīto mikroparaugu inkubatoru.
7. Inkubējiet 72 °C temperatūrā 20 minūtes.
8. Turiet LP2 MIDI plati aukstumā 5 minūtes.

Adapteru ligācija

Šis process ligē adapterus pie cDNS un/vai gDNS fragmentu galiem.

TSO Comprehensive (EU) analīze ietver SUA1 un UMI adapterus.

- Izmantojiet SUA1 adapterus ar RNS paraugiem.
- Izmantojiet UMI adapterus ar DNS paraugiem.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - ALB1 — virpiniet vismaz 10 sekundes, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - LIG3 — nedaudz centrifugējiet un pēc tam pipetējiet, lai sajauktu. Uzglabāt aukstu.
 - SUA1 — virpiniet vismaz 10 sekundes, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - UMI — virpiniet vismaz 10 sekundes, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - STL — nolieciet malā lietošanai procedūrā.

Procedūra

1. Noņemiet LP2 MIDI plati no ledus vai tā ekvivalenta.
2. Pievienojiet 60 µl ALB1 katrā LP2 MIDI plates parauga iedobē. ALB1 ir viskozs šķīdums. Pipetējiet lēnām, lai samazinātu burbuļu veidošanos.
3. Pievienojiet 5 µl LIG3 katrai parauga iedobei.
4. Pievienojiet adapterus, kā norādīts tālāk.
Nekombinējiet dažādu veidu adapterus kopā.
 - **[RNS paraugu iedobes]**— pievienojiet 10 µl SUA1 (zils vāciņš) katram paraugam, kas iegūts no RNS.
 - **[DNS paraugu iedobes]**— pievienojiet 10 µl UMI (balts vāciņš) katram paraugam, kas iegūts no DNS.
5. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz LP2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
6. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
7. Inkubējiet istabas temperatūrā 30 minūtes.
8. Virpiniet STL, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
9. Pievienojiet 5 µl STL katrā LP2 MIDI plates parauga iedobē.
10. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz LP2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
11. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.

Ligācijas attīrīšana

Šis process izmanto SPB, lai attīrītu ar adapteri ligētos cDNs vai gDNS fragmentus un noņemtu nevēlamus produktus. Lodītes mazgā divreiz ar svaigu 80 % etilspirtu. Ar adapteri ligētie paraugi tiek eluēti ar RSB.

Sagatavošana

- Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - SPB — nodrošiniet, ka lodītes atrodas istabas temperatūrā 30 minūtes.
 - RSB — nolieciet malā lietošanai procedūrā.
- Sagatavojiet svaigu 80 % etilspirtu 15 ml vai 50 ml konusveida stobriņā.

22. tabula Sagatavojiet svaigu 80 % etilspirtu.

Reaģents	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas	48 bibliotēkas
100 % EtOH, tīrs	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Virpiniet svaigu 80 % EtOH, lai samaisītu.
- Uzstādiet magnētu.

Procedūra

Saistīšana

- Virpiniet SPB 1 minūti, lai atkārtoti suspendētu lodītes.
- Nekavējoties pievienojiet 112 µl SPB katrai LP2 MIDI plates parauga iedobei.
Ja SPB dozēšanai tiek izmantota tekne, alikvotējot pietiekamu materiāla daudzumu katram paraugam, iekļaujiet tilpuma pārsniegumu ar koeficientu 1,15. Izmetiet atlikušo materiālu pēc tam, kad SPB ir pievienots katrai parauga iedobei.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz LP2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
- Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
- Inkubējiet istabas temperatūrā 5 minūtes.
- Novietojiet LP2 MIDI plati uz magnētiskā statīva uz 10 minūtēm.
- Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.

Mazgāšana

1. Mazgājiet lodītes, kā aprakstīts tālāk.
 - a. Turiet LP2 MIDI plati uz magnētiskā statīva un pievienojiet 200 µl svaiga 80 % EtOH katrā parauga iedobē.
 - b. Uzgaidiet 30 sekundes.
 - c. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.
2. Mazgājiet lodītes **otrrreiz**.
3. Izmantojiet pipeti ar smalkiem uzgaļiem, lai no katras iedobes izņemtu atlikušo EtOH.
4. Izmetiet neizmantoto 80 % EtOH.

Eluēšana

1. Noņemiet LP2 MIDI plati no magnētiskā statīva.
2. Apgrieziet otrādi vai virpiniet RSB, lai samaisītu.
3. Pievienojiet 27,5 µl RSB katrai parauga iedobei.
4. Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz LP2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
5. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
6. Inkubējiet istabas temperatūrā 2 minūtes.
7. Novietojiet LP2 MIDI plati uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
8. Marķējiet jaunu 96 iedobju PCR plati LS (Bibliotēku paraugi).
9. Pārnesiet 25 µl katra eluāta no LP2 MIDI plates iedobes uz atbilstošo LS PCR plates iedobi.
10. Izmetiet tukšo LP2 MIDI plati.

PCR indeksēšana

Šajā darbībā bibliotēkas fragmenti tiek amplificēti, izmantojot praimerus, kas pievieno indeksēšanas sekvenču paraugu multipleksēšanai. Iegūtais produkts satur pilnu cDNS un/vai DNS fragmentu bibliotēku, ko papildina adapteri, kas nepieciešami klasteru ģenerēšanai.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - EPM — glabājiet aukstumā.
 - UPxx — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet. UPxx ir indeksēšanas praimeris, kas izpildes iestatīšanas laikā atlasīts Local Run Manager programmatūras ekrānā Create Run (Izveidot izpildi).

- CPxx — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet. UPxx ir indeksēšanas praimeris, kas izpildes iestatīšanas laikā atlasīts Local Run Manager pogrammatūras ekrānā Create Run (Izveidot izpildi).
2. Pārlicinieties, ka rādītāji katram paraugam atbilst izpildei, kas plānota TSO Comprehensive (EU) analīzes modulī izpildes iestatīšanas laikā. Noteikti ievērojiet norādījumus par rādītāju atlasī sadaļā [Bibliotēku skaits un rādītāju izvēle, 35. lpp.](#)

**UZMANĪBU!**

Nesakrītības starp paraugiem un indeksēšanas praimeriem izraisa nepareizu rezultātu ziņošanu, jo nenotiek pozitīvo paraugu identificēšana.

Procedūra

1. Pievienojiet 5 µl atbilstošā indeksēšanas praimera (UPxx vai CPxx) atbilstošajai parauga iedobei LS PCR platē atbilstoši atlasītajiem rādītājiem.

**UZMANĪBU!**

Vienlaicīgi rīkojieties un atveriet tikai vienu indeksēšanas praimera stobriņu. Uzreiz pēc lietošanas uzlieciet katram indeksēšanas stobriņam jaunu vāciņu. Nekombinējiet indeksēšanas praimerus kopā.

2. Virpiniet EPM 5 sekundes, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
3. Pievienojiet 20 µl EPM katrai parauga iedobei.
4. Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz LS PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
5. Kratiet ar 1200 apgr./min 1 minūti.
6. Novietojiet pirmsamplifikācijas reaģentus atpakaļ glabāšanas vietā.

**UZMANĪBU!**

Veiciet visas turpmākās darbības pēc amplifikācijas zonā, lai novērstu amplifikācijas produktu pārnesi.

7. Centrifugējiet LS PCR plati ar 280 × g 1 minūti.
8. Novietojiet uz iepriekš ieprogrammēta pēc amplifikācijas amplifikatora un palaidiet I-PCR programmu.
Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#)
Ja turpināt ar [Pirmās hibridizācijas iestatīšana, 58. lpp.](#), ievērojiet reaģentu atkausēšanas norādījumus sagatavošanas protokola darbībās.
9. Pēc I-PCR programmas pabeigšanas centrifugējiet LS PCR plati ar 280 × g 1 minūti.
10. Atkārtoti marķējiet plati kā ALS (Amplificēti bibliotēkas paraugi).

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, uzglabājiet ALS PCR plati no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 30 dienām.

Sagatavošanās protokolam

Šis preparāts ir nepieciešams, lai veiktu protokola darbības, kas noved pie nakts hibridizācijas.

1. Pārlicinieties, ka ir iestatītas pēcamplifikācijas amplifikatora programmas. Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#).
2. Izņemiet reaģentu stobriņus no kastes un izpildiet atkausēšanas norādījumus.

23. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Atdzesēts), kaste (PN 20031123)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
TCB1	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Pirmās hibridizācijas iestatīšana

24. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Sasaldēts), kaste (PN 20031121)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
TCA1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Pirmās hibridizācijas iestatīšana

25. tabula TruSight Oncology Comp Content Set, kaste (PN 20031122)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
OPR1 (sarkans vāciņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Pirmās hibridizācijas iestatīšana
OPD2 (balts vāciņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Pirmās hibridizācijas iestatīšana

Pirmās hibridizācijas iestatīšana

Šī procesa laikā oligo kopa hibridizējas uz cDNS bibliotēkām, un cita oligo kopa hibridizējas uz gDNS bibliotēkām, kas sagatavotas darbībā [PCR indeksēšana, 55. lpp.](#). Mērķa apgabalu bagātināšanai nepieciešamas divas hibridizācijas darbības. Pirmajā hibridizācijā nakts laikā (no 8 stundām līdz 24 stundām) oligo hibridizējas uz cDNS un/vai gDNS bibliotēkām.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - TCB1 — sildiet stobriņu 37 °C temperatūrā 5 minūtes. Virpiniet 10 sekundes, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - TCA1 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - OPR1 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - OPD2 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.

- Ja ALS PCR plate tika uzglabāta, atkausējiet līdz istabas temperatūrai un centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti. Pipete, lai sajauktu.
- Marķējiet jaunu 96 iedobju PCR plati kā HYB1 (1. hibridizācija).

Procedūra

- Pārnesiet 20 µl katras cDNS un/vai gDNS bibliotēkas no ALS PCR plates uz atbilstošo iedobi HYB1 PCR platē.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgtu uz ALS PCR plates un nolieciet malā. Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
- Pārbaudiet TCB1, vai nav nogulšņu. Ja ir, vēlreiz sasildiet stobriņu un virpiniet stobriņu, līdz kristāli izšķīst.
- Pievienojiet 15 µl TCB1 katrai bibliotēkas iedobei HYB1 PCR platē.
- Pievienojiet 10 µl TCA1 katrai bibliotēkas iedobei HYB1 PCR platē.
- Pievienojiet zondes.

Nekombinējiet dažādu veidu zondes kopā. Katrā iedobē pievienojiet tikai vienu zondes komplektu.

 - [RNS bibliotēkas iedobes]** — pievienojiet 5 µl OPR1 (sarkans vāciņš) katrai bibliotēkai, kas iegūta no RNS.
 - [DNS bibliotēkas iedobes]** — Pievienot 5 µl OPD2 (balts vāciņš) katrai bibliotēkai, kas iegūta no DNS.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz HYB1 PCR plates. Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
- Kratiet ar 1200 apgr./min 2 minūtes.
- Novietojiet uz amplifikatora un palaidiet HYB1 programmu. Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#)
- Hibridizējiet 57 °C temperatūrā vismaz 8 stundas, bet ne ilgāk kā 24 stundas.
- Novietojiet hibridizācijas reaģentus atpakaļ glabāšanas vietā.
- Uzglabājiet ALS PCR plati no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 30 dienām.

Sagatavošanās protokolam

Šī sagatavošana ir nepieciešama, lai veiktu protokola darbības, kas aizved līdz nākamajam drošajam apstāšanās punktam.

- dienas sākumā izņemiet reaģentu stobriņus no kastes un izpildiet atkausēšanas norādījumus.

26. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Atdzesēts), kaste (PN 20031123)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
SMB (tumši zila etiķete)	No 2 °C līdz 8 °C	Noturiet istabas temperatūrā 30 minūtes.	Pirmo mērķu uztveršana Otrā mērķu uztveršana

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
ET2	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Pirmo mērķu uztveršana Otrā mērķu uztveršana
HP3	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Pirmo mērķu uztveršana Otrā mērķu uztveršana Bibliotēku normalizēšana
TCB1	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Otrās hibridizācijas iestatīšana
RSB	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Otrā mērķu uztveršana Amplificēto bagātināto bibliotēku tīrīšana

27. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Sasaldēts), kaste (PN 20031121)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
EE2	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Pirmo mērķu uztveršana Otrā mērķu uztveršana Bibliotēku normalizēšana
EEW	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Pirmo mērķu uztveršana
TCA1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Otrās hibridizācijas iestatīšana

28. tabula TruSight Oncology Comp Content Set, kaste (PN 20031122)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
OPR1 (sarkans vāciņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Otrās hibridizācijas iestatīšana
OPD2 (balts vāciņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Otrās hibridizācijas iestatīšana

Pirmo mērķu uztveršana

Šī darbība izmanto SMB, lai uztvertu zondes, kas hibridizētas mērķa interesējošajiem reģioniem. Lodītes tiek trīs reizes mazgātas ar EEW. Bagātinātās bibliotēkas tiek eluētas, izmantojot svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu un neitralizējot ar ET2.

Sagatavošana

1. Iepriekš uzsildiet mikroparaugu inkubatoru ar MIDI sildīšanas bloka ieliktni līdz 57 °C.

2. Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - EEW — virpiniet 1 minūti, lai samaisītu.
 - EE2 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - HP3 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - SMB — nodrošiniet, ka lodītes atrodas istabas temperatūrā 30 minūtes. Šai procedūrai noteikti izmantojiet **SMB**, nevis SPB.
 - ET2 — nolieciet malā lietošanai procedūrā.
3. Sagatavojiet svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu mikrocentrifūgas stobriņā.

29. tabula EE2 + HP3 eluēšanas maisījums pirmo mērķu uztveršanai*

Eluēšanas maisījuma komponents	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas	48 bibliotēkas
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Šajā tabulā ir iekļauts tilpuma pārsniegums. Aprēķinus skatiet sadaļā [Reaģentu lietošana, 33. lpp.](#)

4. Virpiniet EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu un pēc tam nedaudz centrifugējiet. Nolieciet malā darbībai [Eluēšana, 62. lpp.](#)
5. Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā CAP1 (1. uztveršana).
6. Uzstādiet magnētu.

Procedūra

Saistīšana

1. Noņemiet HYB1 PCR plati no amplifikatora.
2. Centrifugējiet HYB1 PCR plati ar 280 × g 1 minūti.
3. Virpiniet SMB 1 minūti, lai atkārtoti suspendētu lodītes.
Ja ir nogulsnes vai mikrosfēru granulas, pārliedziniet, ka tās sasniedz istabas temperatūru, pipetējiet uz augšu un uz leju, lai atbrīvotu granulu, un pēc tam maisiet, lai atkārtoti suspendētu.
4. Nekavējoties pievienojiet 150 µl SMB katrai CAP1 MIDI plates bibliotēkas iedobei.
Ja SMB dozēšanai tiek izmantota tekne, lai nodrošinātu pietiekamu materiāla daudzumu katram paraugam, alikvotējot iekļaujiet tilpuma pārsniegumu ar koeficientu 1,15.
5. Kad SMB ir pievienots katrai parauga iedobei, izmetiet atlikušo materiālu.
6. Iestatiet pipeti uz 50 µl un pārnesiet katras bibliotēkas visu tilpumu no HYB1 PCR plates uz atbilstošo CAP1 MIDI plates iedobi.
7. Izmetiet tukšo HYB1 PCR plati.
8. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz CAP1 MIDI plates.

Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.

9. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
10. Inkubējiet iepriekš uzsildītā mikroparaugu inkubatorā 57 °C temperatūrā 25 minūtes.
11. Novietojiet CAP1 MIDI plati uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
12. Turiet plati uz magnētiskā statīva. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.



UZMANĪBU!

Nekavējoties veiciet nākamo darbību ([Mazgāšana, 62. lpp.](#)). Neļaujiet lodīšu kapsulai ilgstoši atrasties bez šķidrums klātbūtnes.

Mazgāšana

1. Mazgājiet lodītes, kā aprakstīts tālāk.
 - a. Noņemiet CAP1 MIDI plati no magnētiskā statīva.
 - b. Pievienojiet 200 µl EEW katrai iedobei.
 - c. Izmantojiet pipeti, kas iestatīta uz 150 µl un pipetējiet vismaz 10 reizes, lai samaisītu. Pārliecinieties, ka visas lodītes ir atkārtoti suspendētas.

Nodrošiniet, ka nav lodīšu kapsulu, uzmanīgi iesūcot uzgalī visu lodīšu šķīdumu no iedobes. Vizuāli pārbaudiet katras iedobes apakšu. Ja redzama lodīšu kapsula, mazgāšanas darbību laikā pipetes galu vērsiet lodīšu kapsulas virzienā, lai to izkustinātu. Nodrošiniet, ka lodīšu kapsula ir pilnībā iegremdēta šķīdumā. Šķīdumam vajadzētu izskatīties tumši brūnam un tam jābūt viendabīgai konsistencei.
 - d. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz CAP1 MIDI plates.
 - e. Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
 - f. Kratiet ar 1800 apgr./min 4 minūtes.
 - g. Inkubējiet mikroparaugu inkubatorā 57 °C temperatūrā 5 minūtes.
 - h. Novietojiet CAP1 MIDI plati uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
 - i. Turiet plati uz magnētiskā statīva. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.
2. Mazgājiet lodītes **otrrreiz**.
3. Mazgājiet lodītes **trešo** reizi.
4. Izmantojiet pipeti ar smalkiem uzgaļiem, lai no katras iedobes izņemtu atlikušo EEW.

Eluēšana

1. Noņemiet CAP1 MIDI plati no magnētiskā statīva.
2. Virpiniet svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
3. Uzmanīgi pievienojiet 17 µl EE2 + HP3 eluēšanas maisījuma katrai bibliotēkas iedobei CAP1 MIDI platē.
4. Izmetiet atlikušo EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu.

- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz CAP1 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
- Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
- Novietojiet uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
- Marķējiet jaunu 96 iedobju PCR plati kā ELU1 (1. eluēšana).
- Virpiniet ET2, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
- Pievienojiet 5 µl ET2 katrai attiecīgajai bibliotēkas iedobei jaunajā ELU1 PCR platē.
- Uzmanīgi pārnesiet 15 µl eluāta no katras CAP1 MIDI plates iedobes uz atbilstošo ELU1 PCR plates iedobi.
- Izmetiet tukšo CAP1 MIDI plati.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz ELU1 PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
- Kratiet ar 1200 apgr./min 2 minūtes.
- Novietojiet EEW atpakaļ glabāšanas vietā.

Otrās hibridizācijas iestatīšana

Šis solis otro reizi sasaista bagātināto cDNS un/vai gDNS bibliotēku mērķa reģionus ar uztveršanas zondēm. Otrā hibridizācija nodrošina augstu uztverto reģionu specifiku. Lai nodrošinātu bibliotēku optimālu bagātināšanu, veiciet otro hibridizācijas darbību 57 °C temperatūrā vismaz 1,5 stundas, bet ne ilgāk kā 4 stundas.

Sagatavošana

- Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - TCB1 — sildiet stobriņu 37 °C temperatūrā 5 minūtes. Virpiniet 10 sekundes, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - TCA1 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - OPR1 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - OPD2 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.

Procedūra

- Pārbaudiet TCB1, vai nav nogulšņu. Ja redzami kristāli, vēlreiz sasildiet stobriņu un virpiniet, līdz tie izšķīst.
- Pievienojiet 15 µl TCB1 katrai bibliotēkas iedobei ELU1 PCR platē.
- Pievienojiet 10 µl TCA1 katrai bibliotēkas iedobei.
- Pievienojiet katrai iedobei to pašu zondi, kas izmantota pirmās hibridizācijas laikā. Katrā iedobē pievienojiet tikai vienu zondes komplektu.
Nekombinējiet dažādu veidu zondes kopā.
 - [RNS bibliotēkas iedobes]** — pievienot 5 µl OPR1 (sarkans vāciņš) katrai bibliotēkai, kas iegūta no RNS.

- **[DNS bibliotēkas iedobes]** — pievienot 5 µl OPD2 (balts vāciņš) katrai bibliotēkai, kas iegūta no DNS.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz ELU1 PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
 - Kratiet ar 1200 apgr./min 2 minūtes.
 - Novietojiet uz amplifikatora un palaidiet HYB2 programmu.
Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#)
 - Hibridizējiet 57 °C temperatūrā vismaz 1,5 stundas, bet ne ilgāk kā 4 stundas.
 - Novietojiet hibridizācijas reaģentus atpakaļ glabāšanas vietā.

Otrā mērķu uztveršana

Šī darbība izmanto SMB, lai uztvertu zondes, kas hibridizētas mērķa interesējošajiem reģioniem. Lodītes tiek mazgātas vienu reizi ar RSB. Bagātinātās bibliotēkas tiek eluētas, izmantojot svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu un neitralizējot ar ET2.

Sagatavošana

- Iepriekš uzsildiet mikroparaugu inkubatoru ar MIDI sildīšanas bloka ieliktni līdz 57 °C.
- Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - EE2 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - HP3 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - SMB — nodrošiniet, ka lodītes atrodas istabas temperatūrā 30 minūtes.
Šai procedūrai noteikti izmantojiet **SMB**, nevis SPB.
 - RSB — nolieciet malā lietošanai procedūrā.
 - ET2 — nolieciet malā lietošanai procedūrā.
- Sagatavojiet svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu mikrocentrifūgas stobriņā.

30. tabula EE2 + HP3 eluēšanas maisījums otrajai mērķu uztveršanai*

Eluēšanas maisījuma komponents	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas	48 bibliotēkas
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Šajā tabulā ir iekļauts tilpuma pārsniegums. Aprēķinus skatiet sadaļā [Reaģentu lietošana, 33. lpp.](#)

- Virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet. Nolieciet malā darbībai [Eluēšana, 66. lpp.](#)
- Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā CAP2 (2. uztveršana).
- Uzstādiet magnētu.

Procedūra

Saistīšana

1. Izņemiet ELU1 PCR plati no amplifikatora.
2. Centrifugējiet ELU1 PCR plati ar 280 × g 1 minūti.
3. Virpiniet SMB 1 minūti, lai atkārtoti suspendētu lodītes.
Ja ir nogulsnes vai mikrosfēru granulas, pārliedziet, ka tās sasniedz istabas temperatūru, pipetējiet uz augšu un uz leju, lai atbrīvotu granulu, un pēc tam maisiet, lai atkārtoti suspendētu.
4. Nekavējoties pievienojiet 150 µl SMB katrai CAP2 MIDI plates bibliotēkas iedobei.
Ja SMB dozēšanai tiek izmantota tekne, lai nodrošinātu pietiekamu materiāla daudzumu katram paraugam, alikvotējot iekļaujiet tilpuma pārsniegumu ar koeficientu 1,15.
5. Kad SMB ir pievienots katrai parauga iedobei, izmetiet atlikušo materiālu.
6. Iestatiet pipeti uz 50 µl un pārnesiet katras bibliotēkas visu tilpumu no ELU1 PCR plates uz atbilstošo CAP2 MIDI plates iedobi.
7. Izmetiet tukšo ELU1 PCR plati.
8. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz CAP2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
9. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
10. Inkubējiet mikroparaugu inkubatorā 57 °C temperatūrā 25 minūtes.
Ja turpināt ar darbību *Bagātinātas bibliotēkas amplificēšana*, 68. lpp., ievērojiet reaģentu atkausēšanas norādījumus sadaļā *Sagatavošanās protokolam* darbībām.
11. Novietojiet uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
12. Turiet CAP2 MIDI plati uz magnētiskā statīva. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.



UZMANĪBU!

Nekavējoties veiciet nākamo darbību (*Mazgāšana*, 65. lpp.). Neļaujiet lodīšu kapsulai ilgstoši atrasties bez šķidrums klātbūtnes.

Mazgāšana

1. Noņemiet CAP2 MIDI plati no magnētiskā statīva.
2. Apgrīziet otrādi vai virpiniet RSB, lai samaisītu.
3. Pievienojiet 200 µl RSB katrai iedobei.
4. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz CAP2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
5. Kratiet ar 1800 apgr./min 4 minūtes.
6. Novietojiet plati uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.

- Turiet plati uz magnētiskā statīva. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.
- Izmantojiet pipeti ar smalkiem uzgaļiem, lai no katras iedobes izņemtu atlikušo RSB.

Eluēšana

- Noņemiet CAP2 MIDI plati no magnētiskā statīva.
- Virpiniet svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
- Pievienojiet 22 µl EE2 + HP3 eluēšanas maisījuma katrai bibliotēkas iedobei CAP2 MIDI platē.
- Izmetiet atlikušo EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz CAP2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
- Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
- Novietojiet uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
- Marķējiet jaunu 96 iedobju PCR plati kā ELU2 (2. eluēšana).
- Virpiniet ET2, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
- Pievienojiet 5 µl ET2 katrai attiecīgajai bibliotēkas iedobei jaunajā ELU2 PCR platē.
- Uzmanīgi pārnesiet 20 µl eluāta no katras CAP2 MIDI plates iedobes uz atbilstošo ELU2 PCR plates iedobi.
- Izmetiet tukšo CAP2 MIDI plati.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz ELU2 PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
- Kratiet ar 1200 apgr./min 2 minūtes.
- Atgrieziet SMB, EE2, HP3, RSB un ET2 glabāšanā.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, centrifugējiet ELU2 PCR plati ar 280 × g 1 minūti un uzglabājiet no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 7 dienām.

Sagatavošanās protokolam

Šī sagatavošana ir nepieciešama, lai veiktu protokola darbības, kas aizved līdz nākamajam drošajam apstāšanās punktam.

- Sagatavojiet ledus spaini vai tam līdzvērtīgu.
- Izņemiet reaģentu stobriņus no kastes un izpildiet atkausēšanas norādījumus.

31. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Sasaldēts), kaste (PN 20031121)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
PPC3	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Bagātinātas bibliotēkas amplificēšana

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Uzglabāt aukstu.	Bagātinātas bibliotēkas amplificēšana

32. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Atdzesēts), kaste (PN 20031123)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
SPB (gaiši zaļa etiķete)	No 2 °C līdz 8 °C	Noturiet istabas temperatūrā 30 minūtes.	Amplificēto bagātināto bibliotēku tīrīšana
RSB	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Amplificēto bagātināto bibliotēku tīrīšana Sagatavošanās sekvencēšanai

Bagātinātas bibliotēkas amplificēšana

Šajā darbībā tiek izmantoti praimerī, lai amplificētu bagātinātās bibliotēkas.

Sagatavošana

1. Ja ELU2 plate tika uzglabāta, atkausējiet līdz istabas temperatūrai un pēc tam centrifugējiet 280 × g 1 minūti.

Procedūra

1. Virpiniet PPC3, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
2. Pievienojiet 5 µl PPC3 katrai ELU2 PCR plates bibliotēkas iedobei.
3. Virpiniet EPM 5 sekundes, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
4. Pievienojiet 20 µl EPM katrai bibliotēkas iedobei.
5. Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz ELU2 PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
6. Kratiet ar 1200 apgr./min 2 minūtes.
7. Novietojiet uz amplifikatora un palaidiet EL-PCR programmu.
Skatiet [Amplifikatoru programmēšana, 41. lpp.](#).
Ja turpināt ar darbību [Bibliotēku normalizēšana, 71. lpp.](#), ievērojiet atkausēšanas norādījumus sadaļā [Sagatavošanās protokolam](#) darbībām.
8. Novietojiet PPC3 un EPM atpakaļ glabāšanas vietā.

Amplificēto bagātināto bibliotēku tīrīšana

Šī darbība izmanto SPB, lai attīrītu bagātinātās bibliotēkas no nevēlamiem reakcijas komponentiem. Lodītes mazgā divreiz ar svaigu 80 % etilspirtu. Bibliotēkas tiek eluētas ar RSB.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - SPB — nodrošiniet, ka lodītes atrodas istabas temperatūrā 30 minūtes. Šai procedūrai noteikti izmantojiet **SPB**, nevis SMB.
 - RSB — nolieciet malā lietošanai procedūrā.
2. Sagatavojiet svaigu 80 % etilspirtu 15 ml vai 50 ml konusveida mēģenē.

33. tabula Sagatavojiet svaigu 80 % etilspirtu.

Reaģents	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas	48 bibliotēkas
100 % EtOH, tīrs	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase- free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Virpiniet svaigu 80 % EtOH, lai samaisītu.
- Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā BIND2 (Tīrīšanas saistīšana).
- Uzstādiet magnētu.

Procedūra

Saistīšana

- Izņemiet ELU2 PCR plati no amplifikatora.
- Centrifugējiet ELU2 PCR plati 280 × g 1 minūti.
- Virpiniet SPB 1 minūti, lai atkārtoti suspendētu lodītes.
- Nekavējoties pievienojiet 110 µl SPB katrai BIND2 MIDI plates bibliotēkas iedobei.
- Pārnesiet 50 µl katras bibliotēkas no ELU2 PCR plates uz atbilstošo BIND2 MIDI plates iedobi.
- Izmetiet tukšo ELU2 PCR plati.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz BIND2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
- Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
- Inkubējiet istabas temperatūrā 5 minūtes.
- Novietojiet BIND2 MIDI plati uz magnētiskā statīva uz 5 minūtēm.
- Turiet plati uz magnētiskā statīva. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.

Mazgāšana

- Mazgājiet lodītes, kā aprakstīts tālāk.
 - Turiet BIND2 MIDI plati uz magnētiskā statīva un pievienojiet 200 µl svaiga 80 % EtOH katrā iedobē.
 - Uzgaidiet 30 sekundes.
 - Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.
- Mazgājiet lodītes **otrrreiz**.
- Izmantojiet pipeti ar smalkiem uzgaļiem, lai no katras iedobes izņemtu atlikušo EtOH.
- Izmetiet neizmantoto 80 % EtOH.

Eluēšana

1. Noņemiet BIND2 MIDI plati no magnētiskā statīva.
2. Apgrieziet otrādi vai virpiniet, lai samaisītu RSB.
3. Pievienojiet 32 µl RSB katrai bibliotēkas iedobei.
4. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz BIND2 MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
5. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
6. Inkubējiet istabas temperatūrā 2 minūtes.
7. Novietojiet uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
8. Marķējiet jaunu 96 iedobju PCR plati kā PL (Attīrītas bibliotēkas).
9. Pārnesiet 30 µl katra eluāta no BIND2 MIDI plates uz atbilstošo PL PCR plates iedobi.
10. Izmetiet tukšo BIND2 MIDI plati.
11. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz PL PCR plates.
12. Novietojiet SPB un RSB glabāšanas vietā.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, centrifugējiet PL PCR plati ar 280 × g 1 minūti un uzglabājiet no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 30 dienām.

Sagatavošanās protokolam

Šī sagatavošana ir nepieciešama, lai veiktu protokola darbības, kas aizved līdz nākamajam drošajam apstāšanās punktam.

1. Izņemiet reaģentu stobriņus no kastes un izpildiet atkausēšanas norādījumus.

34. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Sasaldēts), kaste (PN 20031121)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
LNA1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Bibliotēku normalizēšana
EE2	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai.	Bibliotēku normalizēšana

35. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Atdzesēts), kaste (PN 20031123)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
LNB1	No 2 °C līdz 8 °C	Noturiet istabas temperatūrā 30 minūtes.	Bibliotēku normalizēšana
HP3	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Bibliotēku normalizēšana Sagatavošanās sekvencēšanai

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
LNW1	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Bibliotēku normalizēšana
LNS1	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Bibliotēku normalizēšana

- Ja turpināt tajā pašā dienā ar darbību [Sagatavošanās sekvencēšanai, 75. lpp.](#), izpildiet atkausēšanas norādījumus sadaļā [Sagatavošanās protokolam](#) darbībām.

Bibliotēku normalizēšana

Šajā procesā tiek izmantots LNB1 un piedevas (LNA1), lai normalizētu katru bibliotēkas daudzumu, nodrošinot vienādu bibliotēku pārstāvniecību apkopotajās bibliotēkās. Lodītes mazgā divreiz ar LNW1. Bibliotēkas tiek eluētas ar svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu un neitralizētas ar LNS1.

Sagatavošana

- Sagatavojiet šādus reaģentus.
 - LNB1 — nodrošiniet, ka lodītes atrodas istabas temperatūrā 30 minūtes.
 - LNA1 — virpiniet, lai samaisītu.
 - EE2 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - HP3 — virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
 - LNW1 — virpiniet, lai samaisītu. Nolieciet malā lietošanai procedūrā.
 - LNS1 — virpiniet, lai samaisītu. Nolieciet malā lietošanai procedūrā.
- Virpiniet LNB1 1 minūti, lai atkārtoti suspendētu lodītes. Apgrieziet LNB1 stobriņu, lai pārlicinātos, ka visas lodītes ir atkārtoti suspendētas.
- Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 800 µl, pipetējiet LNB1 augšup un lejup 10 reizes, lai nodrošinātu atkārtotu suspendēšanu.
- Nekavējoties sagatavojiet svaigu LNA1 + LNB1 galveno maisījumu koniskā stobriņā.



UZMANĪBU!

Pilnībā atkārtoti suspendējiet LNB1 lodīšu kapsulu stobriņa apakšā, lai novērstu nevienmērīgu klasteru blīvumu.

36. tabula LNA1 + LNB1 galvenais maisījums*

Galvenā maisījuma sastāvdaļa	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas	48 bibliotēkas
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl

Galvenā maisījuma sastāvdaļa	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas	48 bibliotēkas
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Šajā tabulā ir iekļauts tilpuma pārsniegums. Aprēķinus skatiet sadaļā [Reāģentu lietošana, 33. lpp.](#).

- Virpiniet LNA1+LNB1 galveno maisījumu. Nolieciet malā darbībai [Saistīšana, 72. lpp.](#) darbībai.
- Sagatavojiet svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu mikrocentrifūgas stobriņā.

37. tabula EE2 + HP3 eluēšanas maisījums bibliotēku normalizēšanai*

Eluēšanas maisījuma komponents	4 bibliotēkas	8 bibliotēkas	16 bibliotēkas	24 bibliotēkas	48 bibliotēkas
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Šajā tabulā ir iekļauts tilpuma pārsniegums. Aprēķinus skatiet sadaļā [Reāģentu lietošana, 33. lpp.](#).

- Virpiniet svaigo eluēšanas maisījumu un pēc tam nedaudz centrifugējiet. Nolieciet malā darbībai [Eluēšana, 73. lpp.](#)
- Ja PL PCR plate tika uzglabāta, atkausējiet līdz istabas temperatūrai, centrifugējiet ar 280 × g 1 minūti. Pipete, lai sajauktu.
- Marķējiet jaunu 96 iedobju MIDI plati kā BBN (Uz lodītēm balstīta normalizēšana).
- Uzstādiet magnētu.

Procedūra

Saistīšana

- Virpiniet LNA1+LNB1 galveno maisījumu.
- Nekavējoties pievienojiet 45 µl LNA1 + LNB1 galvenā maisījuma katrai BBN MIDI plates bibliotēkas iedobei.
- Izmetiet atlikušo LNA1 + LNB1 galveno maisījumu.
- Pievienojiet 20 µl katras bibliotēkas no PL PCR plates atbilstošai BBN MIDI plates iedobei.
- Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz BBN MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
- Kratiet ar 1800 apgr./min 30 minūtes.
- Uzklājiet pašlipošo plates noslēgu uz PL PCR plates un novietojiet to glabāšanas vietā.
- Novietojiet BBN MIDI plati uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
- Turiet plati uz magnētiskā statīva. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.

Mazgāšana

1. Mazgājiet lodītes, kā aprakstīts tālāk.
 - a. Noņemiet BBN MIDI plati no magnētiskā statīva.
 - b. Pievienojiet 45 µl LNW1 katrai bibliotēkas iedobei.
 - c. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz BBN MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
 - d. Kratiet ar 1800 apgr./min 5 minūtes.
 - e. Novietojiet BBN MIDI plati uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
 - f. Turiet plati uz magnētiskā statīva. Izmantojot lodīšu pipeti, kas iestatīta uz 200 µl, neaizskarot lodīšu kapsulu, noņemiet un izmetiet visu virsslāni no katras parauga iedobes.
2. Mazgājiet lodītes *otreiz*.
3. Izmantojiet pipeti ar smalkiem uzgaļiem, lai no katras iedobes izņemtu atlikušo virskārtu.

Eluēšana

1. Noņemiet BBN MIDI plati no magnētiskā statīva.
2. Virpiniet svaigu EE2 + HP3 eluēšanas maisījumu un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
3. Pievienojiet 32 µl EE2 + HP3 šķīduma katrai BBN MIDI plates bibliotēkas iedobei.
4. Izmetiet atlikušo eluēšanas maisījumu.
5. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz BBN MIDI plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
6. Kratiet ar 1800 apgr./min 2 minūtes.
7. Novietojiet uz magnētiskā statīva uz 2 minūtēm.
8. Marķējiet jaunu 96 iedobju PCR plati kā NL (Normalizētas bibliotēkas).
9. Uzmaņīgi pārnesiet 30 µl eluāta no katras BBN MIDI plates iedobes uz atbilstošo NL PCR plates iedobi.



UZMANĪBU!

Ja lodītes ir aspirētas pipetes uzgaļos, iepildiet tās atpakaļ platē uz magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (~2 minūtes), pirms turpināt ar procedūras nākamo darbību.

10. Izmetiet tukšo BBN MIDI plati.
11. Virpiniet LNS1, lai samaisītu.
12. Pievienojiet 30 µl LNS1 katrai bibliotēkas iedobei jaunajā NL PCR platē.
13. Pipetējiet piecas reizes, lai samaisītu.
14. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz NL PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
15. Novietojiet LNB1, LNA1, EE2, LNW1 un LNS1 glabāšanas vietā.

DROŠAS APSTĀŠANĀS PUNKTS

Ja pārtraucat darbu, centrifugējiet NL PCR plati ar 280 × g 1 minūti un uzglabājiet no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 32 dienām.

Sagatavošanās protokolam

Šī sagatavošana ir nepieciešama, lai veiktu protokola darbības, kas noved pie sekvencēšanas.

Vismaz stundu pirms lietošanas sāciet sekvencēšanas palīgmateriālu sagatavošanu no NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) (PN 20028871).

- Izņemiet bibliotēkas atšķaidīšanas buferi (HT1) no uzglabāšanas -25 °C līdz -15 °C temperatūrā. Atkausējiet līdz istabas temperatūrai. Pēc atkausēšanas turiet aukstu.
- Ievērojiet sagatavošanas norādījumus *NextSeq 550Dx instrumenta uzziņu ceļvedī (dokuments Nr. 1000000009513)*, kas sniegti citiem komplekta palīgmateriāliem.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cikli)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cikli)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cikli)
- Izņemiet reaģentu stobriņus no kastes un izpildiet atkausēšanas norādījumus.

38. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Sasaldēts), kaste (PN 20031121)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
PhiX Internal Control (PX3 vai PhiX)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet līdz istabas temperatūrai. Pēc atkausēšanas turiet aukstu.	Sagatavošanās sekvencēšanai

39. tabula TruSight Oncology Comp Enrichment (Atdzesēts), kaste (PN 20031123)

Reaģents	Glabāšana	Atkausēšanas norādījumi	Protokola darbība
HP3	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Sagatavošanās sekvencēšanai
RSB (rozā etiķete)	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz telpas temperatūrai.	Sagatavošanās sekvencēšanai

Sagatavošanās sekvencēšanai

Katrā DNS un RNS sekvencēšanas izpildē jāiekļauj pozitīva kontrole un NTC. DNS un RNS NTC tiek atkārtoti sekvencētas pēc nepieciešamības, lai katrā izpildē būtu NTC. Katra DNS un RNS izpilde ietver atsevišķu pozitīvu kontroli.

Sagatavošana

- Pārskatiet vadlīnijas [Bibliotēku skaits un rādītāju izvēle, 35. lpp.](#)
- Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā dHP3 (atšķaidīts HP3).
- Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā dPhiX (atšķaidīts PhiX).
- Uzsildiet siltumbloku mikrocentrifūgas stobriņiem līdz 96 °C.

5. Sagatavojiet ledus spaini vai tam līdzvērtīgu.

Atšķaidiet un denaturējiet PhiX kontroli

1. Virpiniet HP3, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
2. Mikrocentrifūgas dHP3 stobriņā sajauciet tālāk norādītos daudzumus.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Virpiniet dHP3, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
4. Apgrieziet otrādi vai virpiniet RSB, lai samaisītu.
5. Virpiniet PhiX kontroli, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
6. Mikrocentrifūgas dPhiX stobriņā sajauciet tālāk norādītos daudzumus.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX kontroli
7. Pievienojiet dPhiX stobriņam 10 µl dHP3.
8. Izmetiet dHP3 stobriņu.
9. Virpiniet dPhiX stobriņu, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
10. Inkubējiet dPhiX istabas temperatūrā 5 minūtes, lai to denaturētu.
11. Virpiniet HT1, lai samaisītu.
12. Nekavējoties pievienojiet dPhiX 980 µl iepriekš atdzesēta HT1.
13. Virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
14. Glabājiet PhiX aukstumā, līdz tas tiek izmantots otrā atšķaidījuma sagatavošanā.
Galīgā koncentrācija ir 20 pM dPhiX.
15. Novietojiet PhiX, HP3 un RSB atpakaļ glabāšanas vietā.

Bibliotēku apvienošana un denaturēšana TSO Comprehensive (EU) analīzei

1. Ja NL PCR plate tika uzglabāta, atkausējiet līdz istabas temperatūrai un pēc tam centrifugējiet plati ar 280 × g 1 minūti.
2. Izmantojot daudzkanālu pipetes komplektu ar 30 µl tilpumu, piecas reizes uzmanīgi sajauciet bibliotēkas NL PCR platē.
Izmantojiet jaunus uzgaļus katrai bibliotēkai.



UZMANĪBU!

Lai nodrošinātu optimālu veiktspēju, bibliotēkas noteikti labi jā sajauc.

3. Atlasiet vienu no tālāk norādītajām iespējām, lai apvienotu, denaturētu un atšķaidītu bibliotēkas.
 - **[1. iespēja]** Vienlaicīgi sekvencējiet bibliotēkas, kas iegūtas no RNS paraugiem un DNS paraugiem.
Skatiet [1. iespēja. DNS un RNS bibliotēkas kopā, 77. lpp.](#)

- [2. iespēja] Sekvencējiet bibliotēkas, kas iegūtas tikai no DNS paraugiem. Skatiet [2. iespēja. Tikai DNS saturošas bibliotēkas, 78. lpp.](#)
- [3. opcija] Sekvencējiet bibliotēkas, kas iegūtas tikai no RNS paraugiem. Skatiet [3. iespēja. Tikai RNS saturošas bibliotēkas, 79. lpp.](#)

1. iespēja. DNS un RNS bibliotēkas kopā

1. Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā PRL (Apvienotas RNS bibliotēkas).
2. Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā PDL (Apvienotas DNS bibliotēkas).
3. Pārnesiet 10 µl katras normalizētās RNS (cDNS) bibliotēkas no NL plates uz PRL stobriņu. Neapvienojiet divas bibliotēkas ar vienu un to pašu indeksēšanas praimerī.
4. Pārnesiet 10 µl katras normalizētās DNS bibliotēkas no NL plates uz PDL stobriņu. Neapvienojiet divas bibliotēkas ar vienu un to pašu indeksēšanas praimerī.
5. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz NL PCR plates. Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
6. Virpiniet PRL un PDL stobriņus, lai samaisītu.
7. Nedaudz centrifugējiet PRL un PDL stobriņus.
8. Inkubējiet PRL un PDL stobriņus siltumblokā 96 °C temperatūrā 2 minūtes.
9. Turiet PRL un PDL stobriņus aukstumā 5 minūtes.
10. Virpiniet PRL un PDL stobriņus, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
11. Turiet PRL un PDL stobriņus aukstumā.

Pirmā atšķaidījuma sagatavošana

1. Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā DIL1 (1. atšķaidījums).
2. Pārnesiet 20 µl PDL uz tukšu DIL1 stobriņu.
3. Pievienojiet DIL1 5 µl PRL.
4. Izmetiet PDL un PRL stobriņus.
5. Pievienojiet DIL1 stobriņam 475 µl iepriekš atdzesēta HT1 (atšķaidījums 1:20).
6. Virpiniet DIL1 stobriņu, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.

Otrā atšķaidījuma sagatavošana

1. Marķējiet 2,0 ml mikrocentrifūgas stobriņu kā DIL2 (2. atšķaidījums).
2. Pārnesiet 40 µl DIL1 uz tukšu DIL2 stobriņu.
3. Izmetiet DIL1 stobriņu.
4. Pievienojiet DIL2 stobriņam 1660 µl iepriekš atdzesēta HT1 (atšķaidījums 1:850).
5. Virpiniet sagatavoto 20 pM dPhiX, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.

6. Pievienojiet DIL2 stobriņam 2,5 µl sagatavotā 20 pM dPhiX.
7. Virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
8. Ievietojiet 1300 µl DIL2 atkausētā NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cikli).
Papildinformācija pieejama *NextSeq 550Dx instrumenta uzziņu ceļvedī (dokuments Nr. 1000000009513)*.
9. Izmetiet DIL2 stobriņu.
10. Centrifugējiet NL PCR plati ar 280 × g 1 minūti un tad uzglabājiet -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 32 dienām.
11. Turpiniet ar sekvencēšanu.
Papildinformācija pieejama *NextSeq 550Dx instrumenta uzziņu ceļvedī (dokuments Nr. 1000000009513)*.

2. iespēja. Tikai DNS saturošas bibliotēkas

1. Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā PDL (Apvienotas DNS bibliotēkas).
2. Pārnesiet 10 µl katras normalizētās DNS bibliotēkas no NL plates uz PDL stobriņu.
Neapvienojiet divas bibliotēkas ar vienu un to pašu indeksēšanas praimeru.
3. Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz NL PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes.
4. Virpiniet PDL stobriņu, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
5. Inkubējiet PDL stobriņu siltumblokā 96 °C temperatūrā 2 minūtes.
6. turiet PDL stobriņu aukstumā 5 minūtes.
7. Virpiniet PDL stobriņu, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
8. Turiet PDL stobriņu aukstumā.

Pirmā atšķaidījuma sagatavošana

1. Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā DIL1 (1. atšķaidījums).
2. Pārnesiet 10 µl PDL uz tukšu DIL1 stobriņu.
3. Izmetiet PDL stobriņu.
4. Pievienojiet DIL1 stobriņam 190 µl iepriekš atdzesēta HT1 (atšķaidījums 1:20).
5. Virpiniet DIL1, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.

Otrā atšķaidījuma sagatavošana

1. Marķējiet 2,0 ml mikrocentrifūgas stobriņu kā DIL2 (2. atšķaidījums).
2. Pārnesiet 40 µl DIL1 uz tukšu DIL2 stobriņu.
3. Izmetiet DIL1 stobriņu.
4. Pievienojiet DIL2 stobriņam 1660 µl iepriekš atdzesēta HT1 (atšķaidījums 1:850).
5. Virpiniet sagatavoto 20 pM dPhiX un pēc tam nedaudz centrifugējiet.

- Pievienojiet DIL2 stobriņam 2,5 µl sagatavotā 20 pM dPhiX.
- Virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
- Ievietojiet 1300 µl DIL2 atkausētā NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cikli).
Papildinformācija pieejama *NextSeq 550Dx instrumenta uzzīņu ceļvedī (dokuments Nr. 1000000009513)*.
- Izmetiet DIL2 stobriņu.
- Centrifugējiet NL PCR plati ar 280 × g 1 minūti un tad uzglabājiet -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 32 dienām.
- Turpiniet ar sekvencēšanu.
Papildinformācija pieejama *NextSeq 550Dx instrumenta uzzīņu ceļvedī (dokuments Nr. 1000000009513)*.

3. iespēja. Tikai RNS saturošas bibliotēkas

- Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā PRL (Apvienotas RNS bibliotēkas).
- Pārnesiet 10 µl katras normalizētās RNS (cDNS) bibliotēkas no NL plates uz PRL stobriņu.
Neapvienojiet divas bibliotēkas ar vienu un to pašu indeksēšanas praimerī.
- Uzklājiet pašlīpošo plates noslēgu uz NL PCR plates.
Pilnībā noslēdziet malas un iedobes, lai novērstu iztvaikošanu.
- Virpiniet PRL stobriņu, lai samaisītu.
- Nedaudz centrifugējiet PRL stobriņu.
- Inkubējiet PRL stobriņu siltumblokā 96 °C temperatūrā 2 minūtes.
- Turiet PRL stobriņu aukstumā 5 minūtes.
- Virpiniet PRL stobriņu, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
- Turiet PRL stobriņu aukstumā.

Pirmā atšķaidījuma sagatavošana

- Marķējiet mikrocentrifūgas stobriņu kā DIL1 (1. atšķaidījums).
- Pārnesiet 10 µl PRL uz tukšu DIL1 stobriņu.
- Izmetiet PRL stobriņu.
- Pievienojiet DIL1 stobriņam 190 µl iepriekš atdzesēta HT1 (atšķaidījums 1:20).
- Virpiniet DIL1, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.

Otrā atšķaidījuma sagatavošana

- Marķējiet 2,0 ml mikrocentrifūgas stobriņu kā DIL2 (2. atšķaidījums).
- Pārnesiet 40 µl DIL1 uz tukšu DIL2 stobriņu.
- Izmetiet DIL1 stobriņu.
- Pievienojiet DIL2 stobriņam 1646 µl iepriekš atdzesēta HT1 (atšķaidījums 1:843).

- Virpiniet sagatavoto 20 pM dPhiX un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
- Pievienojiet DIL2 stobriņam 16,7 µl sagatavotā 20 pM dPhiX.
- Virpiniet, lai samaisītu, un pēc tam nedaudz centrifugējiet.
- Ievietojiet 1300 µl DIL2 atkausētā NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cikli).
Papildinformācija pieejama *NextSeq 550Dx instrumenta uzziņu ceļvedī (dokuments Nr. 100000009513)*.
- Izmetiet DIL2 stobriņu.
- Centrifugējiet NL PCR plati ar 280 × g 1 minūti un uzglabājiet -25 °C līdz -15 °C temperatūrā līdz 32 dienām.
- Turpiniet ar sekvencēšanu.
Papildinformācija pieejama *NextSeq 550Dx instrumenta uzziņu ceļvedī (dokuments Nr. 100000009513)*.

Rezultātu interpretēšana

TSO Comprehensive (EU) analīzes sekvencēšanas rezultāti tiek ziņoti par katru paraugu atsevišķi PDF atskaitē un JSON atskaitē. Parauga līmenī tiek ģenerēta arī Maza sekvencēšanas dziļuma atskaite (`LowDepthReport.tsv`).

Izpildes līmenī tiek ģenerēti šādi izvades faili:

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

PDF un JSON atskaitēs tiek parādīti tikai tie varianti, kas izturējuši kvalitātes kontroli.

Detalizētu analīzes informāciju skatiet *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedī (dokuments Nr. 200008661)*.

Palīgdiagnostikas rezultāti

Katram palīgdiagnostikas (CDx) paredzētajam lietojumam ir trīs iespējamie rezultāti.

- Pozitīvs** — A variants vai biomarķieris tiek noteikts un klasificēts kā 1. līmenis (CDx).
- Nav noteikts** — paraugā nav konstatēti varianti vai biomarķieri, kas saistīti ar palīgdiagnostikas paredzēto lietojumu. Paraugam atlasītais audzēja veids ir piemērots palīgdiagnostikai.
- Nav rezultāta** — varianta statusa noteikšana nav iespējama viena vai vairāku tālāk norādīto iemeslu dēļ:
 - palīgdiagnostikas paredzētā lietošana nav piemērojama testētajam paraugam, jo paraugam atlasītais audzēja veids nav piemērots palīgdiagnostikas audzēja veidam;
 - sekvencēšanas izpilde neatbilda kvalitātes kontroles specifikācijām;
 - bibliotēkai neizdevās nodrošināt nepieciešamo kvalitātes kontroli;
 - atbilstošā nukleīnskābe netika pārbaudīta.

Visi palīgdiagnostikas paredzētie lietošanas rezultāti tiek ziņoti JSON atskaites sadaļā Companion Diagnostic Results (Palīgdiagnostikas rezultāti). PDF atskaites sadaļā Companion Diagnostic Results (Palīgdiagnostikas rezultāti) ir uzskaitīti tikai paredzētie lietojumi ar pozitīvu rezultātu.

Audzēja profilēšanas varianti

TSO Comprehensive (EU) ir paredzēts, lai ziņotu par somatiskiem variantiem, kad tiek ziņots par variantiem ar klīniski nozīmīgiem pierādījumiem vai variantiem ar potenciālu klīnisko nozīmi. TSO Comprehensive (EU) analīzes programmatūra izmanto zināšanu bāzi, kas nosaka, vai katrs noteiktais un piemērotais variants (2. tabula) ir klīniski nozīmīgs vai potenciāli klīniski nozīmīgs, pamatojoties uz terapeitiskas, diagnostikas vai prognostiskas saistības pierādījumiem. Zināšanu bāze apsver, vai pārbaudītajam audzēja veidam ir (vai nav) noteikta saistība. Zināšanu bāzē nav iekļauta uzņēmības vai vēža riska saistība. Biežāk sastopamie polimorfismi tiek noņemti.

Audzēja profilēšanas variantiem pozitīvie rezultāti tiek klasificēti genoma atradēs ar pierādījumiem par klīnisku nozīmi (2. līmenis) vai genoma atradēs ar potenciālu klīnisko nozīmi (3. līmenis) saskaņā ar instalēto zināšanu bāzi un identificēto audzēja veidu.

Kvalitātes kontroles kļūmes gadījumā netiek rādīti variantu tipu rezultāti, kas ir atbilstoši neveiksmīgās kvalitātes kontroles parametriem. Papildinformāciju skatiet 40. tabula un 41. tabula. Audzēja profilēšanas pozīcijas ar mazu sekvencēšanas dziļumu ir uzskaitītas atskaitē Low Depth Report (Maza sekvencēšanas dziļuma atskaite), nevis TSO Comprehensive (EU) atskaitē.

Kvalitātes kontrole

- Informāciju par nukleīnskābju kvantificēšanu un minimālajām prasībām ievades materiālam skatiet sadaļā [Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana, 27. lpp.](#)
- Sekvencēšanas izpildes un parauga derīgumu nosaka automātiski, un par to ziņo TSO Comprehensive (EU) analīzes modulis. Detalizētu analīzes informāciju skatiet *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedi (dokuments Nr. 200008661)*.
- TSO Comprehensive (EU) atskaitē, kas pieejama PDF un JSON formātos, apkopoti kvalitātes kontroles rezultāti. Atskaišu faili atrodas analīzes mapē. Analīzes mapes (satur PDF un JSON atskaites) un izpildes mapes atrašanās vietu skatiet *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedi (dokuments Nr. 200008661)*.

40. tabula TSO Comprehensive (EU) Atskaites rezultātu kvalitātes kontroles rādītāji

Izvades veids	Rādītāji	Specifikācija	Apraksts	Specifikāciju kļūmes ietekme*
Sekvencēšanas izpilde	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Nolasījumu procentuālā daļa, kas atbilst filtram (PF).	Sekvencēšanas izpilde ir nederīga. Netiek ziņoti neviena parauga rezultāti izpildes laikā.

Izvades veids	Rādītāji	Specifikācija	Apraksts	Specifikāciju kļūmes ietekme*
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	1. nolasījuma vidējais bāžu noteikšanas gadījumu procentuālais īpatsvars ar kvalitātes rādītāju Q30 vai augstāku.	Sekvencēšanas izpilde ir nederīga. Netiek ziņoti neviena parauga rezultāti izpildes laikā.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	2. nolasījuma vidējais bāžu noteikšanas gadījumu procentuālais īpatsvars ar kvalitātes rādītāju Q30 vai augstāku.	
DNS bibliotēkas	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 VAI > 3106 un P_VALUE ≤ 0,049	Parametrs, kurā novērtēta piesārņojuma iespējamība, izmantojot kopējo variantu VAF. Piesārņojuma rezultāts ir balstīts uz VAF SNP izkliedi. Piesārņojuma P vērtību izmanto, lai novērtētu ļoti pārkārtotus genomus. Tas ir piemērojams tikai tad, ja piesārņojuma rādītājs pārsniedz augšējo specifikāciju robežu.	Netiek ziņoti DNS rezultāti.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Parauga fragmentu garuma mediāna.	Netiek ziņoti TMB vai mazo DNS variantu rezultāti.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (skaits)	≥ 150	Eksonu fragmentu pārklājuma mediāna visām eksonu bāzēm.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Eksonu bāzes ar 50X fragmenta pārklājumu procentuālā daļa.	

Izvades veids	Rādītāji	Specifikācija	Apraksts	Specifikāciju kļūmes ietekme*
	USABLE_MSI_SITES (skaits)	≥ 40	MSI vietu skaits, kas izmantojams MSI noteikšanai (mikrosatelītu vietu skaits ar pietiekami plašu nolasījumu skaitu, lai identificētu mikrosatelītu nestabilitāti).	Netiek ziņoti MSI rezultāti.
	COVERAGE_MAD (skaits)	$\leq 0,210$	Absolūto noviržu mediāna no katra CNV mērķa reģiona normalizētā skaita mediānas.	Netiek ziņoti gēnu amplifikācijas rezultāti.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (skaits)	$\geq 1,0$	Neapstrādāta binārā skaita mediāna katram CNV mērķim.	
RNS bibliotēkas	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Parauga fragmentu garuma mediāna.	Netiek ziņoti saplūšanas vai salaidumu variantu rezultāti.

Izvades veids	Rādītāji	Specifikācija	Apraksts	Specifikāciju kļūmes ietekme*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeficients)	≤ 0,93	MEDIAN_CV_GENE_500X ir pārklājuma viendabīguma mērījums. Katram gēnam ar vismaz 500x pārklājumu tiek aprēķināts pārklājuma variācijas koeficients visā gēna garumā. Šis parametrs ir šo vērtību mediāna. Augsta vērtība norāda uz augstu variāciju līmeni un norāda uz problēmu bibliotēkas sagatavošanā, piemēram, zema līmeņa parauga ievadi un/vai zondes izvilkšanas problēmām. Šis parametrs tiek aprēķināts, izmantojot visus nolasījumus (ieskaitot nolasījumus, kas atzīmēti kā dublikāti).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (skaits)	≥ 9 000 000	Kopējais nolasījumu skaits, kas kartēts mērķa reģionos. Šis parametrs tiek aprēķināts, izmantojot visus nolasījumus (ieskaitot nolasījumus, kas atzīmēti kā dublikāti).	

* Veiksmīgi rezultāti rāda PASS (Atbilst).

41. tabula TSO Comprehensive (EU) atskaites rezultātu kontroles parametri

Izvides veids	Rādītāji	Specifikācija	Specifikāciju kļūmes ietekme*
Pozitīvā kontrole	DNS ārējā kontrole	Noteikti 23 no 24 norādītajiem variantiem	Manuāli anulē pacientu paraugus, pamatojoties uz kontroles paraugu rezultātiem. Analīzes moduļa programmatūra automātiski neanulē pacientu paraugus, pamatojoties uz kontroles paraugu rezultātiem.
	RNS ārējā kontrole	Noteikti 12 no 13 norādītajiem variantiem	
Kontrole bez veidnes	DNS eksonu pārklājuma mediāna priekš TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Manuāli anulē pacientu paraugus, pamatojoties uz kontroles paraugu rezultātiem. Analīzes moduļa programmatūra automātiski neanulē pacientu paraugus, pamatojoties uz kontroles paraugu rezultātiem.
	RNS gēns virs robežas mediānas	≤ 1	

* Veiksmīgi rezultāti rāda PASS (Atbilst).

- Atkārtojiet sekvencēšanas ciklus, kas nav derīgi.
- Atkārtojiet bibliotēku testus ar šādiem rezultātiem.
 - Piesārņotas DNS bibliotēkas
 - Nederīgas RNS bibliotēkas
 - Testus var atkārtot, lai iegūtu vairāk variantu vai biomarkieru rezultātu DNS bibliotēkām, kas bija nederīgas vienam, bet ne visiem variantu veidiem.
- Pozitīvās kontroles tiek novērtētas variantu noteikšanai. Ja pozitīvās kontroles neatbilst variantu noteikšanas specifikācijām, manuāli anulējiet sekvencēšanas izpildi. Analīzes moduļa programmatūra automātiski neanulē pacientu paraugus, pamatojoties uz kontroles paraugu rezultātiem.
- NTC tiek novērtētas, salīdzinot ar DNS un gēnu eksonu pārklājumu mediānu, kas ir virs RNS vidējās robežvērtības. Ja negatīvās kontroles neatbilst specifikācijām, manuāli anulējiet bibliotēkas sagatavošanas notikumu un visas saistītās sekvencēšanas izpildes. Analīzes moduļa programmatūra automātiski neanulē pacientu paraugus, pamatojoties uz kontroles paraugu rezultātiem.
- Veiciet papildu kvalitātes kontroles pasākumus saskaņā ar vietējiem, valsts un/vai federālajiem noteikumiem vai akreditācijas prasībām.

Papildinformāciju par sekvencēšanas izpildes vai bibliotēku testu atkārtošānu skatiet [Problēmu novēršana, 86. lpp.](#)

Problēmu novēršana

Izmantojiet tālāk norādīto tabulu, lai novērstu problēmas darbplūsmā. Ja sekvencēšanas izpilde vai bibliotēkas sagatavošana paraugam neizdodas divas reizes, ir nepieciešama papildu problēmu novēršana. Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.

Novērojums	Iespējamais iemesls	Ieteicamā rīcība
Sekvencēšanas izpilde neatbilst izpildes kvalitātes kontroles specifikācijām.	<ul style="list-style-type: none"> • Apkopošanas kļūda • Atšķaidīšanas kļūda • PRL/PDL nepilnīga denaturācija ar karstumu • Problēmas ar sekvencēšanas palīgmateriālu sagatavošanu (piemēram, nav pietiekami atkausētas, kondensāts/gruži plūsmas elementā) 	<ul style="list-style-type: none"> • Veiciet bibliotēku atkārtotu sekvencēšanu no normalizēto bibliotēku (NL) PCR plates. Skatiet sadaļu Sagatavošanās sekvencēšanai, 75. lpp..
	<ul style="list-style-type: none"> • Nepareiza bagātināšanas zonžu izmantošana (piemēram, DNS paraugiem izmantotas OPR1 zondes, RNS paraugiem izmantotas OPD2 zondes) • Kļūda bibliotēkas sagatavošanas darbplūsmā pirmās hibridizācijas darbības laikā vai pēc tās. 	Atkārtoti bagātiniet bibliotēkas no amplificēto bibliotēku paraugu (ALS) PCR plates. Skatiet sadaļu Pirmās hibridizācijas iestatīšana , 58. lpp..
	Neatbilst parauga ievades prasībām	Sāciet bibliotēkas sagatavošanu no darbplūsmas sākuma. Skatiet sadaļu RNS denaturēšana un renaturēšana , 43. lpp. vai gDNS fragmentēšana , 48. lpp..

Novērojums	Iespējamais iemesls	Ieteicamā rīcība
	Kļūda bibliotēkas sagatavošanas darbplūsmā rādītāju PCR darbības laikā vai pirms tās	Atkārtoti bagātiniet bibliotēkas no amplificēto bibliotēku paraugu (ALS) PCR plates. Skatiet sadaļu Pirmās hibridizācijas iestatīšana , 58. lpp..
	Instrumenta problēma	Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.
Kļūda ar pārskata ģenerēšanu vai vispārēja instrumenta kļūda (tīkla kļūda, kļūda ar reaģentu ielādēšanu/izlādēšanu utt.)	Programmatūras vai instrumenta problēma.	Skatiet Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedi (dokuments Nr. 200008661), lai saņemtu palīdzību saistībā ar atskaites sagatavošanu. Lai saņemtu papildu palīdzību, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.
DNS bibliotēka neatbilst kvalitātes kontroles specifikācijām.	Neatbilst parauga ievades prasībām.	Nodrošiniet atbilstošu parauga ievadi un atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu no darbības gDNS fragmentēšana. Skatiet sadaļu Paraugu prasības , 26. lpp. un Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana , 27. lpp..
	Izmantošanas vai aprīkojuma kļūda analīzes darbplūsmā.	Atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu no kādas no tālāk minētajām darbībām atkarībā no tā, kur radās aizdomas par lietošanas vai aprīkojuma kļūdu. Ja nav zināms vai ir radušās citas kļūdas, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai veiktu procedūras traucējummeklēšanu. <ul style="list-style-type: none"> • Veiciet bibliotēku atkārtotu sekvencēšanu no normalizēto bibliotēku (NL) PCR plates. Skatiet sadaļu Sagatavošanās sekvencēšanai, 75. lpp.. • Atkārtoti bagātiniet bibliotēkas no amplificēto bibliotēku paraugu (ALS) PCR plates. Skatiet sadaļu Pirmās hibridizācijas iestatīšana, 58. lpp.. • Sāciet bibliotēkas sagatavošanu no darbplūsmas sākuma. Skatiet sadaļu gDNS fragmentēšana, 48. lpp..

Novērojums	Iespējamais iemesls	Ieteicamā rīcība
	CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE kritēriji nav izpildīti.	<p>Skatiet informāciju sadaļā Brīdinājumi un piesardzības pasākumi, lai izvairītos no savstarpējās piesārņošanas.</p> <p>Pārskatiet plates izkārtojumu un bibliotēkas indeksēšanu, lai nodrošinātu, ka tā paša rādītāja bibliotēkas netiek sekvencētas kopā. Ieteiktajām bibliotēkām sāciet bibliotēku sagatavošanu no darbplūsmas sākuma. Skatiet sadaļu gDNS fragmentēšana, 48. lpp.</p> <p>Parauga ekstrakcijas laikā var būt radies piesārņojums. Var būt nepieciešams atkārtot ekstrakciju, lai nodrošinātu, ka paraugs ir bez piesārņojuma.</p>
	Lietojamā MSI neizdevās.	<p>Pārskatiet ultraskaņas ierīces ražotāja iestatījumus lietošanai un darbībai (ieskaitot ūdens līmeni un stobriņu veidu).</p> <p>Nodrošiniet atbilstošu parauga ievadi analīzē. Skatiet sadaļu Paraugu prasības, 26. lpp. un Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana, 27. lpp.</p> <p>Ja paraugs ir pārāk fragmentēts vai bojāts, var būt nepieciešama jauna parauga ekstrakcija un/vai gDNS fragmentēšanas darbības atkārtošana.</p>
	Paraugšs ir pārāk fragmentēts vai tam var būt nukleīnskābju bojājumi, kas ietekmē spēju ģenerēt pietiekamas unikālas bibliotēkas.	<p>Skatiet sadaļu Ultraskaņas apstrādes ierīces iestatījumi DNS fragmentēšanai, 23. lpp. un ultraskaņas apstrādes ierīces ražotāja iestatījumus lietošanai un darbībai (ieskaitot ūdens līmeni un stobriņa veidu).</p> <p>Nodrošiniet atbilstošu parauga ievadi analīzē. Skatiet sadaļu Paraugu prasības, 26. lpp. un Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana, 27. lpp.</p> <p>Ja paraugs ir pārāk fragmentēts vai bojāts, var būt nepieciešama jauna parauga ekstrakcija un/vai gDNS fragmentēšanas darbības atkārtošana.</p>

Novērojums	Iespējamais iemesls	Ieteicamā rīcība
RNS bibliotēka neatbilst kvalitātes kontroles specifikācijām.	Neatbilst parauga ievades prasībām.	Nodrošiniet atbilstošu parauga ievadi un atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu no darbības RNS denaturēšana un renaturēšana. Skatiet sadaļu Paraugu prasības, 26. lpp. un Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana, 27. lpp.
	Izmantošanas vai aprīkojuma kļūda analīzes darbplūsmā.	Atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu no kādas no tālāk minētajām darbībām atkarībā no tā, kur radās aizdomas par lietošanas vai aprīkojuma kļūdu. Ja nav zināms vai ir radušās citas kļūdas, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai veiktu procedūras traucējummeklēšanu. <ul style="list-style-type: none"> • Veiciet bibliotēku atkārtotu sekvencēšanu no normalizēto bibliotēku (NL) PCR plates. Skatiet sadaļu Sagatavošanās sekvencēšanai, 75. lpp. • Atkārtoti bagātiniet bibliotēkas no amplificēto bibliotēku paraugu (ALS) PCR plates. Skatiet sadaļu Pirmās hibridizācijas iestatīšana, 58. lpp. • Sāciet bibliotēkas sagatavošanu no darbplūsmas sākuma. Skatiet sadaļu RNS denaturēšana un renaturēšana, 43. lpp.
	Paraugi ir pārāk fragmentēti vai tam var būt nukleīnskābju bojājumi, kas ietekmē spēju ģenerēt pietiekamas unikālas bibliotēkas.	Nodrošiniet atbilstošu parauga ievadi. Skatiet sadaļu Paraugu prasības, 26. lpp. un Nukleīnskābju ekstrakcija, kvantificēšana un uzglabāšana, 27. lpp. Ja paraugs ir pārāk fragmentēts vai bojāts, var būt nepieciešama jauna parauga ekstrakcija.

Novērojums	Iespējamais iemesls	Ieteicamā rīcība
Pozitīvās kontroles kļūme (DNS/RNS)	Netika izpildītas parauga ievades prasības pozitīvajai kontrolei.	<p>Nodrošiniet atbilstošu ievadi analīzē. Pārskatiet plates izkārtojumu un pārliedziniet, ka atbilstošie reaģenti (zondes, rādītāji) ir pareizās iedobēs. Nodrošiniet, ka pozitīvās kontroles paraugs tiek glabāts saskaņā ar etiķeti. Visiem paraugiem, kuriem ir viena pozitīvā kontrole, atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu no kādas no tālāk minētajām darbībām atkarībā no tā, kur radās aizdomas par lietošanas vai aprīkojuma kļūdu. Ja nav zināms vai ir radušās citas kļūdas, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai veiktu procedūras traucējummeklēšanu.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Veiciet bibliotēku atkārtotu sekvencēšanu no normalizēto bibliotēku (NL) PCR plates. Skatiet sadaļu Sagatavošanās sekvencēšanai, 75. lpp.. • Atkārtoti bagātiniet bibliotēkas no amplificēto bibliotēku paraugu (ALS) PCR plates. Skatiet sadaļu Pirmās hibridizācijas iestatīšana, 58. lpp.. • Sāciet bibliotēkas sagatavošanu no darbplūsmas sākuma. Skatiet sadaļu RNS denaturēšana un renaturēšana, 43. lpp. vai gDNS fragmentēšana, 48. lpp.
	Izmantošanas vai aprīkojuma kļūda analīzes darbplūsmā.	
NTC kļūme (DNS/RNS).	Radusies savstarpēja piesārņošana vai darba zonas piesārņošana.	Skatiet sadaļu Brīdinājumi un piesardzības pasākumi, lai iegūtu informāciju par darba zonu attīrīšanu un šķērspiesārņojuma novēršanu. Pārskatiet plates izkārtojumu un bibliotēkas indeksēšanu, lai nodrošinātu, ka tā paša rādītāja bibliotēkas netiek sekvencētas kopā. Atkārtojiet bibliotēkas sagatavošanu no darbplūsmas sākuma visām bibliotēkām, kurām ir kopīga kontrole bez veidnes.
	Nepareiza bibliotēkas indeksēšana.	

Novērojums	Iespējamais iemesls	Ieteicamā rīcība
Programmatūra norāda, ka sekvencēšanas izpildē netika iekļautas pozitīvās un/vai negatīvās kontroles.	Nepareiza vēža veida piešķiršana Local Run Manager izpildes plānošanā.	Atkārtoti ievietojiet rindā analīzi ar pareizi identificētām kontrolēm, kā norādīts Analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedī (skatiet <i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedi (dokuments Nr. 200008661)</i>).

Veiktspējas raksturlielumi

TSO Comprehensive (EU) ir mērķa NGS panelis, kas nosaka izmaiņas 517 gēnos. Mazie DNS varianti (viens nukleotīda varianti [SNV]), vairāku nukleotīdu varianti [MNV], insercijas un delēcijas) ir piemēroti pārskatam par visiem 517 gēniem. Audzēja mutācijas slogs tiek ziņots kā rādītājs, pamatojoties uz nevadītāju somatisko variantu skaitu uz megabāzi (sīkāku informāciju skatīt *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) analīzes moduļa darbplūsmas ceļvedi (dokuments Nr. 200008661)*). MSI tiek ziņots kā statuss. Gēnu amplifikācijas ir piemērotas pārskatam par MET un ERBB2 gēniem. Saplūšanas ir piemērotas ziņošanai no 23 gēniem, kas norādīti sadaļā [Analīzes kopsavilkums un skaidrojums, 1. lpp.](#). Salaidumu varianti ir piemēroti pārskatam par MET un EGFR gēniem. Lai iegūtu pārskatu, varianti ir jānosaka, un TSO Comprehensive (EU) analīzes zināšanu bāzē jābūt liecībām par tiem, kā arī tiem jābūt piemērotiem, pamatojoties uz testēto audu veidu. Lai iegūtu pārskatu, NTRK saplūšanām ir nepieciešams saplūšanas partneris ar 5' un NTRK kināzes domēnam jābūt neskartam.

Mazajiem DNS variantiem tika veikta reprezentatīva pieeja paneļa mērķa gēnu validācijai ar datiem, kas pārstāv SNV, MNV, insercijas un delēcijas. Gēnu amplifikācijām, saplūšanām un salaidumu variantiem testēšana tika veikta gēnu līmenī. TMB un MSI tika novērtēti, kur norādīts. Attiecībā uz palīgdiagnostikas apgalvojumiem par NTRK saplūšanām — FFPE paraugos saplūšanas tika pārbaudītas pētījumos, kas galveno uzmanību pievērta apgalvojumiem atbilstošajai veiktspējai (piemēram, noteikšanas robežai, laboratorijas precizitātei, atkārtotamībai, pareizībai un klīniskajai veiktspējai).

[42. tabula](#) ir sniegta dažādos pētījumos aprēķināto parametru definīcijas.

42. tabula Parametru definīcijas

Termins	Definīcija
Pozitīvā procentuālā sakritība (PPA)	Pareizi noteiktu pozitīvo rezultātu procentuālais daudzums no kopējā pozitīvo rezultātu daudzuma attiecībā pret ortogonālo metodi.
Negatīvā procentuālā sakritība (NPA)	Pareizi noteiktu negatīvo rezultātu procentuālais daudzums no kopējā negatīvo rezultātu daudzuma attiecībā pret ortogonālo metodi.

Termins	Definīcija
Kopējā procentuālā sakritība (OPA)	Pareizi noteiktu pozitīvo un negatīvo rezultātu procentuālais daudzums no kopējā novērojumu daudzuma attiecībā pret ortogonālo metodi.
Procentuālie pozitīvie noteikšanas gadījumi (PPCV)	Novērojumu procentuālā daļa, kas ir pozitīva mērķa noteikšanai, ņemot vērā novērojumus, kuri sagaidāmi kā pozitīvi attiecībā uz mērķi.
Procentuāli negatīvie noteikšanas gadījumi (PNC)	Novērojumu procentuālā daļa, kas ir negatīva mērķa noteikšanai, ņemot vērā novērojumus, kuri sagaidāmi kā negatīvi attiecībā uz mērķi.
n/N	Pozitīvu vai negatīvu novērojumu skaits (n), dalīts ar kopējiem novērojumiem (N), lai attiecīgi aprēķinātu PPC vai PNC. n un N vērtības var būt dažādos līmeņos (piemēram, variantā vai gēnā) vai kombinēt grupā (piemēram, SNV).
Standartnovirze (SD)	Mainīgā vērtību variāciju apjoma mērs attiecībā pret tā vidējo vērtību.
Variācijas koeficients procentos (%CV)	Standarta novirze dalīta ar vidējo vērtību procentos.

Šķerspiesārņojums

Savstarpējas piesārņošanas pētījums tika veikts, lai novērtētu, vai rodas kļūdaini pozitīvi rezultāti, kas saistīti ar piesārņošanu starp iedobēm parauga bibliotēkas sagatavošanas laikā vai piesārņošanu starp secīgām izpildes reizēm. Šī analīze tika veikta maziem DNS variantiem (kas arī ietiek TMB), saplūšanām, gēnu amplifikācijai un MSI. Bibliotēkas tika sagatavotas no raksturotiem paraugiem šaha plates izkārtojumā ar mainīgiem paraugiem, lai novērtētu piesārņojumu starp iedobēm, un ar pamīšus mainītiem rādītājiem, lai novērtētu piesārņojumu starp sekvencēšanas cikliem un izpildēm, veicot secīgu sekvencēšanu vienā un tajā pašā NextSeq 550Dx instrumentā. Savstarpējās piesārņošanas pētījumā netika novērots neviens piesārņojuma notikums, pārbaudot katrā paraugā konstatētos variantus, un netika konstatēti kļūdaini pozitīvi rezultāti.

Lai noteiktu parauga piesārņojumu DNS paraugos, TSO Comprehensive (EU) analīzei tika izstrādāti divi kvalitātes kontroles rādītāji (CONTAMINATION_SCORE un P_VALUE). Tika novērtēta piesārņojuma noteikšanas jutība. FFPE audzēja DNS paraugi tika sajaukti ar dažādiem daudzumiem FFPE normālu audu DNS paraugiem, lai izveidotu apzināti piesārņotus paraugus.

Kopumā tika radīti 1112 piesārņojuma novērojumi, un piesārņojums tika konstatēts 95 % (1054) novērojumu. Noteikšanas līmenis palielinājās līdz 96 % (939/976), kad piesārņojuma procentuālais daudzums bija no 10 % līdz 90 % (masas attiecības). No 37 novērojumiem ar piesārņojumu no 10 % līdz 90 %, kur piesārņojums netika konstatēts, 12 neatbilda pārklājuma specifikācijai, lai noteiktu mazos DNS variantus. Zems pārklājums kavē

piesārņojuma noteikšanu, bet mazie DNS varianti netiek ziņoti, kas mazina piesārņojuma ietekmi. Piecpadsmit novērojumi neatbilda gēnu amplifikācijas specifiskajai (vidēja binārā skaita kvalitātes kontroles raksturlielums), lai noteiktu gēnu amplifikāciju. Paraugiem netiks ziņots par gēnu amplifikācijas rezultātiem.

Pētījums apliecināja, ka TSO Comprehensive (EU) analīzei ir paredzams mazs šķērspiesārņojums starp iedobēm vai starp izpildēm. Šie rezultāti kopā ar piesārņojuma rādītājiem programmatūrā samazina nepatiesu variantu rezultātu risku parauga piesārņojuma dēļ.

Nukleīnskābju ekstrakcijas komplekta novērtējums

Trīs komerciāli pieejami DNS un RNS ekstrakcijas komplekti tika novērtēti ar TSO Comprehensive (EU). Trīs ekstrakcijas komplekti izolēja gan DNS, gan RNS no tām pašām FFPE audu daļām. Komplekti atšķīrās ar parafīna noņemšanas līdzekļiem un nukleīnskābju saistīšanas darbībām (43. tabula). 1. komplekts bija dominējošais ekstrakcijas komplekts, ko izmanto, lai noteiktu TSO Comprehensive (EU) veikspēju.

43. tabula Komplekta raksturojums

Komplekts	Parafīna noņemšanas līdzeklis	Nukleīnskābju saistīšana
1	Patentēts	Sleja
2	Ksilols	Sleja
3	Minerāleļļa	Magnētiskās lodītes

44. tabula un 45. tabula ir apkopota ekstrakcijas komplektu ietekme uz bibliotēkas derīgumu un variantu noteikšanu. Atšķirība tika ziņota, ja variantu noteikšanai ekstrakcijas komplekta vidējie rādītāji bija ievērojami atšķirīgi. Vidējās atšķirības starp ekstrakcijas komplektiem tika aprēķinātas ar 1. komplektu kā kontroli, jo 1. komplekts tika izmantots, lai iegūtu lielāko daļu nukleīnskābju TSO Comprehensive (EU) analītiskajiem pētījumiem. Tika ziņots par vidējo atšķirību salīdzinājumā ar 1. komplektu, lai ilustrētu, kā dažādi ekstrakcijas komplekti ietekmēs citus TSO Comprehensive (EU) analītiskos pētījumus.

44. tabula Ekstrakcijas komplekta ietekme uz bibliotēkas derīgumu

Varianta tips	Bibliotēkas kvalitātes kontroles parametri	Vidējā atšķirība attiecībā pret 1. komplektu
DNS mazie varianti / TMB	Eksonu pārklājuma mediāna (skaits) PCT Exon 50X (%) Vidējais insercijas izmērs (bp)	2. komplekts zemāks par 56 lasījumiem 3. komplekts augstāks par 0,298 % 2. un 3. komplekts zemāks par 3 bp
DNS MSI	Izmantojamās MSI vietas	3. komplekts augstāks par 8 cietām
DNS gēnu amplifikācija	Pārklājuma MAD (skaits) Vidējais binārais skaits	2. komplekts zemāks par 0,0043 2. komplekts zemāks par 0,5825, 3. komplekts augstāks par 0,3086

Varianta tips	Bibliotēkas kvalitātes kontroles parametri	Vidējā atšķirība attiecībā pret 1. komplektu
RNS (saplūšanas/salaidumu varianti)	Vidējais insercijas izmērs (bp) Logaritmiskais (vidējā CV Gene500X) Kopsumma par mērķa nolasījumiem	3. komplekts augstāks par 2 bp 2. komplekts augstāks par 0,029 Nav būtiskas atšķirības

Tika novērots, ka ekstrakcijas 2. komplektam un 3. komplektam ir palielināti atbalsta lasījumi, lai saplūšanām un salaidumu variantiem LoD tuvumā būtu lielāka noteikšanas iespējamība ekstrakcijas komplekta izvēles dēļ.

45. tabula Ekstrakcijas komplekta ietekmes uz variantu noteikšanu

Varianta veids (vienības)	Variantu noteikšana (vidējā atšķirība attiecībā pret 1. komplektu)
Mazie DNS varianti (VAF)	Nav tehniski nozīmīga Mērķa varianti: izkliede starp komplektiem bija neliela, salīdzinot pret atlikumu Nemērķa varianti: nav būtisku atšķirību pirmajos divos VAF nodalījumos. Nav nozīmīgu atšķirību, kad novērota statistiskā nozīmība.
TMB (mutācijas megabāzē)	Nav tehniski nozīmīgi, dispersija starp komplektiem bija maza, salīdzinot ar atlikumu
MSI (% nestabilās vietas)	3. komplekts zemāks par 1,9 % nestabilo vietu
Gēnu amplifikācijas (kārtu izmaiņas)	2. komplektam (0,06) un 3. komplektam (0,08) ir lielākas kārtu izmaiņas
Saplūšanas (atbalstošie nolasījumi)	2. komplektam bija par 51 %, un 3. komplektam bija par 23 % lielāks atbalstošo nolasījumu skaits
Salaiduma varianti (atbalstošie nolasījumi)	2. komplektam un 3. komplektam bija par 48 % lielāks atbalstošo nolasījumu skaits

Traucējošās vielas

Tika novērtēta iespējamo endogēno un eksogēno vielu ietekme uz TSO Comprehensive (EU) analīzes veikspēju. Endogēnas vielas (melanīns un hemoglobīns) tika ievadītas paraugos nukleīnskābju ekstrakcijas procesa laikā. Eksogēnas vielas (etilspirts, ksilols un K proteināze) bija nukleīnskābju ekstrakcijas procesā, un tās pirms bibliotēkas sagatavošanas tika ievadītas arī attīrītajā nukleīnskābē. Gadījumos, kad tika novērota mijiedarbība ar pievienotu proteināzi K, tika novērtēta arī paaugstināta proteināzes K koncentrācija ekstrakcijas procesa laikā. Bibliotēkas sagatavošanas laikā tika pievienoti papildu rādītāju praimeru (15 % un 30 %). Izņemot rādītāju praimerus, vielas tika pievienotas FFPE paraugiem no smadzenēm, krūtīm, resnās zarnas, plaušām, medulārajiem vairogdziedzera, NSŠPV, olnīcu, prostatas, siekalu dziedzera, ādas, mīkstajiem audiem un vairogdziedzera audiem — astoņi paraugi tika izgūti DNS analīzei un 13 tika izgūti RNS analīzei. Indeksa praimeriem DNS analīzei tika izmantoti seši FFPE paraugi no trim dažādiem audu tipiem (vairogdziedzera,

urīnpūšļa, resnās zarnas), un RNS analīzei tika izmantoti pieci FFPE paraugi no četriem dažādiem audu tipiem (plaušu, vairogdziedzera, resnās zarnas, krūts). Katram no 16 unikālajiem paraugiem tika izmantota neievadīta endogēnā kontrole un buferšķīdums vai eksogēnā kontrole ar ūdeni. Nekrozes ietekme tika novērtēta uz citu komplektu ar astoņiem FFPE paraugiem no smadzeņu, resnās zarnas un plaušu audiem. Katram nekrozes paraugam tika veikta kontrole ar paraugu, kam veikta nekrozes makrodisekcija. Ar visām traucējošajām vielām katrs paraugs tika testēts ar četriem atkārtojumiem katrai vielai, izmantojot TSO Comprehensive (EU) analīzi un salīdzināti ar attiecīgās kontroles nosacījumu, lai noteiktu mazos DNS variantus, gēnu amplifikācijas, RNS saplūšanas un RNS salaidumu variantus, kā arī MSI statusu un TMB rādītāju. Tika iekļauti gan palīgdiagnostikas, gan audzēja profilēšanas.

DNS variantu noteikšana

Melanīns (0,2 µg/ml), hemoglobīns (2 mg/ml), etilspirts (5 %), proteīnāze K (0,04 mg/ml nukleīnskābē) un ksilols (0,0001 %) netraucē TMB rādītāju, MSI statusu, mazo DNS variantu un gēnu amplifikācijas noteikšanu.

RNS variantu noteikšana

Dati nesatur informāciju par melanīna (0,2 µg/ml), etilspirta (5 %) un ksilola (0,0001 %) traucējošu ietekmi uz RNS saplūšanas vai salaidumu variantiem. Hemoglobīns (2 mg/ml) traucēja (samazināti atbalstošie nolasījumi) ar trim dažādiem MET gēna salaidumu variantiem. Netika ietekmēts AR gēna (trīs dažādi paraugi) un viena EGFR gēna (viens paraugs) salaiduma variants. Ja laboratorijā ar analīzi tiek apstrādāta RNS, jāizvairās no audiem ar hemoglobīna saturu vai tas jāsamazina, iegūstot griezumus no audu bloka.

Proteīnāze K (0,04 mg/ml nukleīnskābē) traucēja RNS saplūšanām un salaidumu variantiem. Proteīnāze K tika pārbaudīta ar 2,6 mg/ml un 5,2 mg/ml ekstrakcijas procesa laikā, kas ir 2x un 4x standarta koncentrācija komerciāli pieejamā komplektā. Proteīnāze K inhibēja saplūšanas ar 4x koncentrāciju, bet neietekmēja ar 2x. Salaidumu varianti tika inhibēti pie 2x proteīnāzes K koncentrācijas. Proteīnāzes K vai līdzvērtīgu enzīmu koncentrāciju ekstrakcijas laikā nedrīkst palielināt salīdzinot ar standarta koncentrācijas, kas norādīta ekstrakcijas komplektā.

Salaiduma variants, kas atbalsta lasījumus, samazinās ar 30% atlikuma rādītāju praimeriem, bet ne ar 15% atlikumu.

Nekroze

Nekrotisku audu klātbūtne līdz 70 % apmērā netraucēja TMB rādītāju, MSI statusu vai mazo DNS variantu noteikšanu. RNS saplūšanas (atbalstošo nolasījumu) un gēnu amplifikācijas (kārtu izmaiņas) noteikšana bija samazināta paraugos ar ≥ 25 % un ≥ 23 % (pēc laukuma) nekrotisko audu saturu. Ja parauga secējumos ir vairāk nekā ≥ 23 % nekrozes kopējā audu laukumā, tad jāveic nekrotisko audu makrodisekcija.

Stabilitāte

Stabilitāte reāllaikā

Reāllaika stabilitāte tika izmantota, lai noteiktu TSO Comprehensive (EU) analīzes komplekta derīguma termiņu, ja tas tiek glabāts atbilstoši nosacījumiem etiķetē. Pētījuma struktūra tika balstīta uz trīs reaģentu partiju testēšanu un izmantoja CLSI EP25-A aprakstīto klasiskās stabilitātes pētījuma struktūru. Komplekti pētījuma laikā tika uzglabāti gala komplektācijas konfigurācijā uzglabāšanas apstākļos, kas definēti produkta etiķetē. Sasaldētā komplekta sastāvdaļas tika uzglabātas no -15 °C līdz -25 °C temperatūrā. Atdzesētā komplekta sastāvdaļas tika uzglabātas no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā.

Noteiktos laika punktos komplekti tika pārbaudīti attiecībā uz izskatu un funkcionālajiem komplekta izlaišanas kritērijiem. Kvalitātes kontroles materiālam tika analizētas arī variantu noteikšanas un parauga kvalitātes kontroles parametru tendences. Katram reaģentam tika noteikts derīguma termiņš. Derīguma termiņa datumi tiek piešķirti, pamatojoties uz ražošanas datumu un uzglabāšanas laiku. Komplekta derīguma termiņš tiek piešķirts, pamatojoties uz reaģentu, kam visagrāk beidzas derīguma termiņš.

Komplekta stabilitāte lietošanas laikā

TSO Comprehensive (EU) analīzes komplekta stabilitāte lietošanas laikā tika novērtēta standarta lietošanas apstākļos paredzētajā uzglabāšanas termiņa laikā, lai atbalstītu vairākas komplekta izmantošanas reizes. Reaģentu komplekts tika vairākkārt sasaldēts/atkausēts un testēts, lai atbalstītu līdz 4 komplekta lietošanas reizēm. Turklāt 8 RNS un 8 DNS bibliotēkas tika sagatavotas kopā 3 reizes, lai pārbaudītu maksimālo atbalstīto bibliotēku skaitu (24 DNS un 24 RNS bibliotēkas ar katru komplektu). Visi funkcionālie komplekta izlaišanas kritēriji tika izpildīti visiem sasaldēšanas-atkausēšanas cikliem un pārbaudītajiem laika punktiem. Tika veikta FFPE paraugu testēšana ar reaģentiem, kuru vecums ≥ 25 mēnešiem, lai novērtētu testēšanas ietekmi lietošanas gaitā uz variantu noteikšanu. Mērķēto variantu kvalitatīvā analīze liecina, ka lietošanas notikumi neietekmēja variantu noteikšanu.

Nukleīnskābes stabilitāte

Nukleīnskābju (DNS un RNS) stabilitāte un ar to saistītā kvantifikācija lietošanai ar TSO Comprehensive (EU) analīzi tika novērtēta, izmantojot FFPE paraugus no vairākiem audu veidiem. FFPE bloki tika secēti, un visas nukleīnskābes tika izgūtas uzreiz. Izgūtā nukleīnskābe tika rūpīgi sajaukta, kvantificēta, pārbaudīta nukleīnskābju kvalitāte un sadalīta divos vienreiz lietojamu stobriņu kompleksos, lai sasaldētu divos laika punktos: T0 kontrole (bāzlinija) un T1 tests (≥ 28 dienas). Visa ekstrahētā RNS tika uzglabāta no -85 °C līdz -65 °C temperatūrā, un visa ekstrahētā DNS tika uzglabāta no -25 °C līdz -15 °C norādīto laika periodu un pēc tam apstrādāta ar TSO Comprehensive (EU) analīzi vairākos replikātos, ko izpildīja vairāki operatori. T1 testa stāvoklis tika salīdzināts ar kontroli MSI statusam, TMB rādītājam, gēnu amplifikācijai, mazajiem DNS variantiem, RNS saplūšanām un RNS salaidumu variantiem. Dati liecina, ka nukleīnskābes un ar tām saistītā kvantifikācija lietošanai ar TSO Comprehensive (EU) analīzi ir stabila līdz 28 dienām, ja tiek uzglabātas ieteicamajā temperatūrā (RNS no -85 °C līdz -65 °C temperatūrā un DNS no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā).

Bibliotēkas stabilitāte

Bibliotēku stabilitāte, izmantojot katru no sešiem testa drošajiem apstāšanās punktiem (skatiet [5. tabula](#)), tika novērtēta, izmantojot FFPE paraugus no vairākiem audu veidiem. Kontroles bibliotēkas (T0, bez apstāšanās punktiem) tika sekvencētas uzreiz darbplūsmas beigās. Aliquots no tām pašām bibliotēkām tika turēti pieturpunktos no -25 °C līdz -15 °C uz laiku (T1), lai atbalstītu [5. tabula](#) uzskaitītās dienas. T1 tika salīdzināts ar T0 maziem DNS variantiem, TMB, gēnu amplifikācijas, MSI, RNS saplūšanas un RNS salaidumu variantiem ar CDx un audzēja profilēšanas variantiem. Dati norāda, ka no TSO Comprehensive (EU) analīzes ģenerētās bibliotēkas ir stabilas saskaņā ar lietošanas instrukciju.

Uz priekšmetstikliņiem novietoto FFPE audu stabilitāte

Uz priekšmetstikliņiem novietoto FFPE audu stabilitāte lietošanai ar TSO Comprehensive (EU) analīzi tika novērtēta, griežot FFPE blokus (5 µm griezumos) no dažādiem unikāliem paraugiem, novietojot uz priekšmetstikliņiem, pēc tam uzglabājot istabas temperatūrā (22 °C) 2 laika posmus. RNS tika ekstrahēta un uzglabāta temperatūrā no -65 °C līdz -85 °C, un DNS tika ekstrahēta un uzglabāta temperatūrā no -15 °C līdz -25 °C mazāk nekā 1 nedēļu pirms testēšanas. Nukleīnskābes materiāls tika kvantificēts un pēc tam apstrādāts ar TSO Comprehensive (EU) analīzi 24 stundu laikā katram laika punktam. Katrā laika punktā ar TSO Comprehensive (EU) analīzi tika testēti vairāki replikāti un operatori katram paraugam un salīdzināti ar T0 laika punktu MSI, TMB, gēnu amplifikācijām, mazajiem DNS variantiem, RNS saplūšanām un RNS salaidumu variantiem, tostarp palīgdiagnostikas un audzēja profilēšanas variantiem. Variantu noteikšana tika novērtēta un atbilda visiem pieņemšanas kritērijiem, norādot, ka uz priekšmetstikliņiem novietoti FFPE audi lietošanai ar TSO Comprehensive (EU) analīzi ir stabili istabas temperatūrā līdz 4 nedēļām (28 dienām). Tiek atzīmēts, ka operatora un uzglabāšanas laika kombinācijas dēļ pēc 4 nedēļām (28 dienām) tika konstatēts MSI bibliotēkas kvalitātes kontroles derīguma līmeņa samazinājums par 10%. RNS saplūšanas un salaidumu variantu atbalsta lasījumu samazinājums pēc uzglabāšanas slaidos 4 nedēļas (28 dienas) bija par aptuveni 29%.

Nukleīnskābes ievades titrēšanas aizsargs

TSO Comprehensive (EU) analīzes nukleīnskābes ievade tika novērtēta, testējot DNS no 33 FFPE paraugiem, kas aptver 17 audu veidus ar ievades līmeņiem no 10 ng līdz 500 ng, un testējot RNS no 5 FFPE paraugiem no 5 audu veidiem ar ievades līmeņiem no 10 ng līdz 85 ng. Tika novērtēti bibliotēkas kvalitātes kontroles parametri, un tie bija atkarīgi no parauga. DNS rezultāti parādīja, ka daži, bet ne visi DNS parauga kvalitātes kontroles parametri reaģē uz palielinātu ievadi virs nominālās 40 ng ievades.

- MEDIAN_INSERT_SIZE nereaģēja uz ievadi, kas pārsniedza 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE uzrādīja pozitīvu korelāciju ar pieaugošu ievadi.
- PCT_EXON_50X palielinājās, palielinoties ievadei līdz 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES palielinājās, palielinoties ievadei. Daži paraugi ar mazāk nekā 40 USABLE_MSI_SITES pie 40 ng atbilda specifikācijai pie lielākām ievadēm, kas ļautu aprēķināt MSI rezultātu.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET palielinājās, palielinoties ievadei.
- Palielinoties ievadei, COVERAGE_MAD palielinājās līdz augšējai specifikācijas robežai.

RNS parauga kvalitātes kontroles parametri palielinājās (MEDIAN_INSERT_SIZE un TOTAL_ON_TARGET_READS) vai samazinājās (MEDIAN_CV_GENE_500X) no 10 ng līdz 40 ng, bet kopumā nemainījās ar ievadi no 40 ng līdz 85 ng.

Tukšā robeža

Kļūdaini pozitīvo rezultātu procentuālais daudzums (no kopējiem sagaidāmiem negatīvajiem) tika novērtēts, atkārtojot FFPE normālo vai labdabīgo, blakus esošo audu testēšanu, kuriem nevajadzētu saturēt somatiskos variantus mazajiem DNS variantiem, gēnu amplifikācijām, MSI, RNS saplūšanām un RNS salaidumu variantiem. Kļūdaini pozitīvi rezultāti netika analizēti attiecībā uz TMB, jo nav klīniskās robežvērtības. Seši DNS un 6 RNS FFPE paraugi tika apstrādāti divos eksemplāros, to veicot 2 operatoriem 3 dienu laikā ar 2 reaģentu partijām. Paraugu apakškopa tika atkārtoti apkopota un atkārtoti sekvencēta tikai 3x DNS un tikai 3x RNS formātā, lai novērtētu kļūdaini pozitīvos rezultātus vairākām multipleksa konfigurācijām, ko atbalsta šī ierīce. Turklāt tika analizēti 30 papildu RNS paraugi divos eksemplāros, kas tika apstrādāti ar 1 reaģentu partiju, sadalot starp 2 operatoriem. Kopumā bija iespējami 168 DNS novērojumi un 228 RNS novērojumi, kuru skaitu samazināja nederīgas bibliotēkas katram varianta veidam. Kļūdaini pozitīvo rezultātu procentuālais daudzums tika aprēķināts gēnu līmenī amplifikācijām un pozīcijas līmenī (aptuveni 1,9 miljoni pozīciju) mazajiem DNS variantiem. DNS variantu tipu kļūdaini pozitīvo rezultātu procentuālā daļa ir parādīta [46. tabula](#). TSO Comprehensive (EU) nav CDx (1. līmenis) apgalvojumu maziem DNS variantiem, tāpēc 1. līmenim nav ziņots par maziem DNS variantiem kļūdaini pozitīvi rezultāti. 271 viltus pozitīvo rezultātu nolīdzināja TSO Comprehensive (EU) zināšanu bāze. Netika iegūti kļūdaini pozitīvi rezultāti klīniski nozīmīgi (2. līmenis). 3. līmenī bija 4 kļūdaini pozitīvi rezultāti, kas izrietēja no 2 variantiem 4 (2,4 %) novērojumos no 168 novērojumiem. Kļūdaini pozitīvo rezultātu procentuālais daudzums RNS saplūšanai un salaidumu variantiem bija 0 %, kā parādīts [47. tabula](#).

46. tabula Kļūdaini pozitīvie rezultāti pēc DNS varianta tipa

Varianta tips	Kļūdaini pozitīvi rezultāti
Gēnu amplifikācija	0 % (0/9912)
Mazie DNS varianti	0,0001 % (271/295, 801, 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Nav attiecināms*

* Kļūdaini pozitīvi rezultāti nav attiecināmi, jo TMB tiek ziņots kā rezultāts un tam nav kvalitatīva rezultāta.

47. tabula Kļūdaini pozitīvie rezultāti pēc RNS varianta tipa

Varianta tips	Kļūdaini pozitīvi rezultāti
Saplūšana	0 % (0/227)
Salaiduma variants	0 % (0/227)

Noteikšanas robeža

Tika veikti divi pētījumi, lai novērtētu TSO Comprehensive (EU) noteikšanas robežu. 1. pētījumā tika novērtēti RET mazie DNS varianti, RET saplūšanas un NTRK1–3 saplūšanas. 2. pētījumā tika novērtēti citi audzēja profilēšanas varianti.

1. pētījums

Tika noteiktas NTRK1, NTRK3 un RET mazo DNS variantu, un NTRK1–3 un RET saplūšanas noteikšanas līmenis (LoD). LoD ir zemākā analīta vērtība (piemēram, varianta alēles biežums vai atbalstītie nolasījumi), ko var konsekventi noteikt (95 % noteikšanas robeža vai II tipa kļūda 5 %). Pētījumā tika izmantoti FFPE audi ar RET mazajiem DNS variantiem (medulārs vairogdziedzera vēzis), RET saplūšanas (papilārs vairogdziedzera vēzis, atipisks Špica audzējs) un NTRK1–3 saplūšanas (zemas pakāpes glioma, multiformā glioblastoma, miofibroblastiskā sarkoma, sarkoma, krūts dziedzeru vēzis, resnās zarnas vēzis), kā arī ar FFPE apstrādāta šūnu līnija ar NTRK1 un NTRK3 mazajiem DNS variantiem. Katrs paraugs tika atšķaidīts līdz vismaz 5 testēšanas līmeņiem (diapazonā no aptuveni 0,01–0,10 VAF mazajiem DNS variantiem un 2–25 atbalstītiem nolasījumiem saplūšanām). Tika veikti 18 novērojumi katram testa līmenim katrā partijā, katrā variantā, ko ģenerēja 3 operatori, un 3 sekvencēšanas instrumenti, ar kuriem tika uzsākta bibliotēkas sagatavošana 3 dienās, kas nebija secīgas, ar 2 atkātojumiem katrā parauga testa līmenī. Tika testētas divas reaģentu partijas.

DNS variantiem 2 partijas tika analizētas neatkarīgi, izmantojot varbūtības regresiju vai noteikšanas biežuma pieeju (zemākais testa līmenis ar noteikšanas biežumu (punktu novērtējums) $\geq 95\%$), lai noteiktu LoD katra variantam katrā partijā. Lielākā LoD abās reaģentu partijās tika pieņemta par varianta noteikšanas robežu ([48. tabula](#)).

RNS saplūšanai tika izmantotas FFPE šūnu līnijas, lai novērtētu katra saplūšanas gēna LoD vērtības. Pēc tam LoD tika pārbaudītas ar FFPE audiem, izmantojot dubultu bibliotēkas sagatavošanu, ko veica 3 operatori ar 3 instrumentiem un ar 3 reaģentu partijām, lai ģenerētu 54 novērojumus katram variantam tās LoD vērtības tuvumā, kas noteikta ar FFPE šūnu līnijām. Katras saplūšanas paziņotās noteikšanas robežas ([49. tabula](#)) ir zemākās vidējās atbalstīto nolasījumu vērtības, kas sasniedz noteikšanas biežumu (punkta aplēsi) $\geq 95\%$.

48. tabula NTRK1, NTRK3 un RET mazo DNS variantu noteikšanas robeža

Marķieris	Chr ¹	Pozīcija	Atsauce	Alternatīva	Noteikšanas robeža (Variantu alēles biežums)
NTRK1 G595R (SNV) ²	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV) ²	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV) ²	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV) ²	Chr15	88472468	C	G	0,027

Marķieris	Chr ¹	Pozīcija	Atsauce	Alternatīva	Noteikšanas robeža (Variantu alēles biežums)
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (delēcija) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = hromosoma

² Šie DNS varianti tika analizēti ar varbūtības regresiju; pārējie DNS varianti tika analizēti ar noteikšanas biežuma pieeju.

49. tabula NTRK un RET saplūšanu noteikšanas robeža

Gēns	Saplūšana	Noteikšanas robeža (atbalstītie nolasījumi)
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. pētījums

Tika novērtētas audzēja profilēšanas variantu noteikšanas robežas (LoDs), kuras ziņoja TSO Comprehensive (EU). LoD ir zemākā analīta vērtība (varianta alēles biežums, izmaiņu attiecība vai atbalstītie nolasījumi), ko var konsekventi noteikt (95 % noteikšanas biežums vai II tipa kļūda 5 %). FFPE paraugi no 17 audu veidiem, kas satur variantus, tika atšķaidīti līdz vairākiem testēšanas līmeņiem. Divi operatori katrā līmenī ģenerēja sešus novērojumus, katrs izmantojot citu reaģentu partiju un instrumentu.

DNS varianti

LoD 10 mazo DNS variantu klasēm (kopā 25 varianti) un 2 DNS gēnu amplifikācijām (ERBB2 un MET) tika noteiktas un apkopotas kā diapazoni ([50. tabula](#)). Ir iekļauti arī RET varianti no 1. pētījuma LoD. Divām no 3 insercijām, kas lielākas par 5 bp, LoD bija 0,034 un 0,036 VAF, trešajai LoD bija 0,215 VAF. Pēdējā bija insercija zemas sarežģītības reģionā, kur insercija pievieno papildu atkārtojumus, ietekmē izlīdzināšanu, un tai nepieciešams vairāk nolasījumu konsekventai noteikšanai. Tāpēc daži zemas sarežģītības genomiskie konteksti var ietekmēt inserciju noteikšanu > 5 bp.

50. tabula Mazo DNS variantu un gēnu amplifikāciju noteikšanas robeža

Tips (LoD mērvienība)	Variantu klase / genoma konteksts	Variantu skaits	Diapazons (VAF)
Mazie DNS varianti (varianta alēļu biežums)	SNV	5	0,016–0,064
	MNV	3	0,022–0,048
	Insercija (1-2 bp) homopolimēra atkārtojumu tuvumā	2	0,086–0,104
	Insercija (1-2 bp) dinukleotīdu atkārtojumu tuvumā	2	0,038–0,051
	Insercija (3-5 bp)	2	0,030–0,056
	Insercija (> 5 bp un līdz 25 bp)	3	0,034–0,215
	Delēcija (1-2 bp) homopolimēra atkārtojumu tuvumā	2	0,094–0,100
	Delēcija (1-2 bp) dinukleotīdu atkārtojumu tuvumā	2	0,033–0,070
	Delēcija (3-5 bp)	2	0,028–0,064
Delēcija (> 5 un līdz 25 bp)	2	0,047–0,055	
Gēnu amplifikācijas (izmaiņu attiecība)	Pēc gēna (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Nemērķa variantu analīze tika veikta no 1. pētījuma paraugiem, kam bija vismaz pieci testēšanas līmeņi. Katrs nemērķētais variants tika analizēts individuāli, un LoD tika aprēķināta tikai variantiem ar vismaz vienu līmeni > 0 % un ≤ 95 % biežuma pieejas un vismaz vienu līmeni ≥ 95% biežuma pieejas. [51. tabula](#) parādītas procentīles kopā ar minimālo un maksimālo LoD, kas novērotas pēc klases nemērķa variantiem. Nemērķētie varianti nodrošina vairāk variantu pēc klases, nekā tika testēti 2. pētījumā, un atbilst LoD diapazoniem no [50. tabula](#).

51. tabula Kopsavilkuma statistika noteikšanas robežvērtībām pēc nemērķa variantu klases (no 1. pētījuma)

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

Saplūšanas

LoD tika noteiktas 19 saplūšanām, kas TSO Comprehensive (EU) panelī atbilst 20 gēniem, kuru atbalstītie nolasījumi bija diapazonā no 9 līdz 31,3 (52. tabula). Citā pētījumā tika testēti vēl 3 gēni (NTRK1–3). RET gēns tika testēts šeit un otrā pētījumā. Sešpadsmit saplūšanām ar noteiktām LoD dati atbilda kopējai LoD no 16 atbalstītiem nolasījumiem, izmantojot abpusēju, 95 % augšējo ticamības robežu (UCL). Divām saplūšanām LoD bija 24,7 un 31,3 atbalstītiem nolasījumiem, kas neatbilda kopējai LoD.

FGFR2-SRPK2 saplūšanai ar LoD vērtību 24,7 atbalstītiem nolasījumiem bija atkārtotas pārklāšanās reģioni pārtraukuma vietā, kā norādīts TSO Comprehensive (EU) analīzes programmatūras anotācijā. Atkārtotiem reģioniem pārtraukuma vietā parasti ir zemāks pierādījumu līmenis, jo nolasījumi var kartēties citur genomā vai arī tie var palikt nesavietoti. Turklāt atkārtotie reģioni savienošanas procesu (izmanto, lai identificētu saplūšanas sekvences) padara sarežģītāku un prasa papildu pierādījumus, lai izveidotu pareizo secību. SEPT14-EGFR ir vēl viens saplūšanas piemērs ar homologu sekvenci pārtraukuma vietā.

Saplūšanai BCL2-IGHJ5 ar LoD vērtību 31,3 atbalstītiem nolasījumiem bija ļoti īss gēns (IGHJ5) ar pārtraukuma vietu tuvu eksona sākumam, kam nepieciešami īsi savietojumi ar atstarpēm. Līdz ar to konsekventai noteikšanai bija nepieciešams vairāk nolasījumu.

52. tabula Saplūšanu noteikšanas robeža

Saplūšana	Gēna A pārtraukuma vieta	Gēna B pārtraukuma vieta	LoD	Kopējā LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	Jā
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	Jā
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	Jā
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	Jā
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	Jā
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	Jā
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	Jā
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	Jā

Saplūšana	Gēna A pārtraukuma vieta	Gēna B pārtraukuma vieta	LoD	Kopējā LoD
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	Jā
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	Jā
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	Nē
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	Jā
CD74-ROS1; GOPC	149784243	117645578	9,2	Jā
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	Jā
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	Jā
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	Jā
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	Jā
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	Nē
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	Jā

Salaiduma varianti

Diviem RNS salaidumu variantiem, MET un EGFR, LoD bija attiecīgi 18,7 un 16,7 atbalstītiem nolasījumiem.

Audzēju saturs

Pētījuma rezultāti formulē ieteikumus par audzēju saturu klīniskajiem paraugiem. Kopumā, jo lielāks ir audzēja saturs, jo spēcīgāks ir signāls (VAF, izmaiņu attiecība vai atbalstītie nolasījumi) audzēja variantiem. Ieteikumi par minimālo audzēju saturu ir balstīti uz tālāk norādītajiem novērojumiem. Mazo DNS variantu LoD vērtības nav lielākas par 0,104 VAF (izņemot TP53 inserciju). Lai noteiktu virzošās mutācijas audzējā (0,50 varianta alēles biežums), ieteicams 20 % audzēja saturs, lai šīm mutācijām būtu 0,10 VAF un tās būtu LoD vērtības līmenī vai virs tā. Ar audzēja saturu 20 % gēni, kas amplificēti līdz izmaiņu attiecībai 5,5 (11 kopijas), tiktu konsekventi noteikti, pamatojoties uz noteikšanas robežu, kuras izmaiņu attiecība ir 1,8. Ar audzēja saturu 20 % saplūšanas ar 74 atbalstītiem nolasījumiem tiktu konsekventi noteiktas, pamatojoties uz atbalstīto nolasījumu noteikšanas robežu 14,7.

Reproducējamība

Tika veikti divi pētījumi, lai novērtētu TSO Comprehensive (EU) analīzes atkārtotamību. 1. pētījumā papildus NTRK un RET saplūšanas variantiem tika novērtēti RET mazie DNS varianti. 2. pētījumā tika novērtēti papildu audzēja profilēšanas varianti.

1. pētījums

Šis pētījums tika veikts, lai novērtētu TSO Comprehensive (EU) analīzes atkārtojamību 3 testēšanas centros (1 iekšējā, 2 ārējos) ar 2 operatoriem katrā centrā, 2 atkārtojumiem katrā izpildē un 3 testēšanas dienās, kas nebija secīgas. Testēšana tika veikta ar reproducējamības paneli, ietverot DNS paraugus, kas satur specifiskus zināmus RET mazos DNS variantus, un RNS paraugus, kas satur specifiskus zināmus NTRK1–3 un RET saplūšanas variantus no formalinā fiksētiem, parafinā iegulstiem (FFPE) audu paraugiem un šūnu līnijām. Panelis saturēja DNS un RNS paneļa elementus ar zemu variantu līmeni un augstu variantu līmeni ar vienādu zema un augsta līmeņa paneļa komponentu skaitu katrai variantu klasei. Augsta līmeņa paneļa komponentu mērķis bija aptuveni 2–3 reizes lielāks par LoD, un zema līmeņa paneļa komponentu mērķis bija aptuveni LoD līmenī. Katrā centrā katrs operators paneļa komponentus testēja 3 reizes divos eksemplāros, katram paneļa komponentam ģenerējot 6 novērojumus. No visiem 3 centriem katram paneļa komponentam tika ģenerēti 36 novērojumi (3 centri/instrumenti × 2 operatori × 2 atkārtojumi izpildē × 3 sākuma dienas).

Kā primārie mērķa kritēriji tika noteikti PPC un PNC mērķa mazajiem DNS variantiem un mērķa RNS saplūšanas variantiem augstā līmenī. PPC un PNC mērķa mazajiem DNS variantiem un mērķa RNS saplūšanas variantiem zemā līmenī tika aprēķināti kā sekundārie mērķa kritēriji. Divpusējos 95 % ticamības intervālus (CI), kas saistīti ar mērķa kritērijiem, aprēķināja, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi. Primārās analīzes tika veiktas, lai novērtētu PPC un PNC (ar saistīto 95 % TI) mērķa augsta līmeņa paneļa komponentos, apvienojot TSO Comprehensive (EU) analīzes novērojumus konkrētajam mērķim paneļa komponentu grupā, kas pārstāv piemērojamo variantu klasi (piemēram, mazos DNS variantus un RNS saplūšanas), izmantojot dažādus centrus/instrumentus, operatorus un izpildes. Katram mērķa variantam TSO Comprehensive (EU) analīzes novērojumi citos paneļa komponentos ar augstu līmeni, kas mērķēts uz to pašu variantu tipu, bet nesatur to pašu variantu, kas noteikts ar vairākuma noteikumu, tika apvienoti ar aprēķināto PNC. Līdzīgi tika noteikti kopējie PPC un PNC zema līmeņa mērķa paneļa komponentiem.

RET mazie DNS varianti

Augsta līmeņa mazo DNS variantu paneļa komponentiem kopējais PPC bija 100,0 % (207/207; 95 % TI: no 98,2 % līdz 100,0 %) (53. tabula). Kopējais PNC augsta līmeņa mazo DNS variantu paneļa komponentiem bija 100,0 % (1035/1035; 95 % TI: no 99,6 % līdz 100,0 %) (54. tabula). Zema līmeņa mērķa mazo DNS variantu paneļa komponentiem kopējais PPC zema līmeņa mērķa mazo DNS variantu paneļa komponentiem bija 99,1 % (210/212; 95 % TI: no 96,6 % līdz 99,7 %), un kopējais PNC bija 100,0 % (1026/1026; 95 % TI: no 99,6 % līdz 100,0 %).

53. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes PPC, lai noteiktu RET mazos DNS variantus augsta un zema līmeņa mērķa paneļa komponentos

Varianta līmenis	Varianta tips	Mērķa variants (nukleotīds)	Mērķa variants (amīnoskābe)	N	Vidējais VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95 % TI 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)
	Delēcija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Visi mazie DNS varianti ir augsta līmeņa	Visi mazie DNS varianti ir augsta līmeņa	Visi mazie DNS varianti ir augsta līmeņa	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)
	Delēcija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Visi mazie DNS varianti ir zema līmeņa	Visi mazie DNS varianti ir zema līmeņa	Visi mazie DNS varianti ir zema līmeņa	212	N/A ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Saīsinājumi: Nav, nav piemērojams; VAF, varianta alēles biežums.

² Divpusējo 95 % ticamības intervālu aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

54. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes PNC, lai noteiktu RET mazos DNS variantus augsta un zema līmeņa mērķa paneļa komponentos

Varianta līmenis	Varianta tips	Mērķa variants (nukleotīds)	Mērķa variants (aminoskābe)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % TI 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)
	Delēcija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Visi mazie DNS varianti ir augsta līmeņa	Visi mazie DNS varianti ir augsta līmeņa	Visi mazie DNS varianti ir augsta līmeņa	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)
	Delēcija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Visi mazie DNS varianti ir zema līmeņa	Visi mazie DNS varianti ir zema līmeņa	Visi mazie DNS varianti ir zema līmeņa	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Visi novērojumi, kas apvienoti no paneļa komponentu variantu kombinācijām, kurām vairākuma noteikšana ir negatīva (mērķa varianti, kas ietver saplūšanas ar mazāk nekā 50 % pozitīvo noteikšanas gadījumu).

² Divpusējo 95 % ticamības intervālu aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

55. tabula parādīta varianta alēļu biežuma (VAF) dispersijas komponentu analīze aptuveni 36 novērojumos katram paneļa elementam. Standartnovirze (SD) un variācijas koeficients procentos (%CV; kopējais un katram avotam) tika aprēķināts un attēlots katram mērķa RET mazajam DNS variantam.

55. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes VAF dispersijas komponentu analīze mērķa mazo DNS variantu paneļa komponentiem

Varianta līmenis	Varianta tips	Mērķa variants (nukleotīds)	Mērķa variants (Aminoskābe)	N	Vidējais VAF	Centra SD (%CV)	Operatora SD (%CV)	Dienas SD (%CV)	Atkārtojuma SD (%CV)	Kopējā 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)
	Delēcija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,011 (5,5)	0,017 (8,6)	0,020 (10,2)
Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,6)	0,010 (10,1)	
~1 x 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)
	Delēcija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	0,002 (2,5)	0,006 (9,9)	0,004 (6,4)	0,010 (16,2)	0,013 (20,2)
Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8)	0,000 (0,0)	0,003 (9,1)	0,006 (15,9)	0,008 (22,9)	

NTRK 1–3 un RET saplūšanas

Augsta līmeņa RNS saplūšanas paneļa komponentiem kopējais PPC bija 99,3 % (285/287; 95 % TI: no 97,5 % līdz 99,8 %) (56. tabula). PPC bija 100 % katram augsta līmeņa paneļa komponentam, izņemot BCAN-NTRK1 paneļa komponentu (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % TI: no 81,9 % līdz 98,5 %]). Kopējais PNC augsta līmeņa RNS saplūšanas paneļa komponentiem bija 100,0 % (1724/1724; 95 % TI: no 99,8 % līdz 100,0 %) (57. tabula). Zema līmeņa mērķa RNS saplūšanas paneļa komponentiem kopējais PPC bija 95,4 % (272/285; 95 % TI: 92,3 %, 97,3 %), un kopējais PNC bija 100,0 % (1851/1851; 95 % TI: no 99,8 % līdz 100,0 %).

56. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes PPC, lai noteiktu NTRK un RET saplūšanu augsta un zema līmeņa mērķa paneļa komponentiem

Varianta līmenis	Mērķa saplūšana	N	Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs	PPC (%) (n/N)	95 % TI*
~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)
	Visas saplūšanas, augsts	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)
	Visas saplūšanas, zems	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* Divpusējo 95 % ticamības intervālu (TI) aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

57. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes PNC, lai noteiktu NTRK un RET saplūšanu augsta un zema līmeņa paneļa komponentiem, kas nav mērķis

Varianta līmenis	Mērķa saplūšanas	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 % TI 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)
	Visas saplūšanas, augsts	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)
	Visas saplūšanas, zems	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Visi novērojumi, kas apvienoti no paneļa komponentu variantu kombinācijām, kurām vairākuma noteikšana ir negatīva (mērķa varianti, kas ietver saplūšanas ar mazāk nekā 50 % pozitīvo noteikšanas gadījumu).

² Divpusējo 95 % ticamības intervālu (TI) aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

58. tabula parādīta atbalstīto nolasījumu dispersijas komponentu analīze aptuveni 36 novērojumos katrā mērķa sapludināšanā. SD un %CV (kopējais un katram avotam) tika aprēķināti un parādīti katrai mērķa saplūšanai.

58. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes dispersijas komponentu analīze atbalstītiem nolasījumiem mērķa RNS saplūšanas paneļa komponentiem

Varianta līmenis	Saplūšana	N	Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs	Centra SD (%CV)	Operatora SD (%CV)	Dienas SD (%CV)	Atkārtojuma SD (%CV)	Kopējā 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. pētījums

Otrs pētījums tika veikts, lai novērtētu TSO Comprehensive (EU) analīzes atkārtojamību 3 testēšanas centros (2 ārējos un 1 iekšējā), ar 2 operatoriem/instrumentiem katrā centrā, 3 unikālām reaģentu partijām 4 testēšanas dienās (kas nav secīgas), veicot 2 sekvencēšanas izpildes katrai paraugu bibliotēkai.

Testēšana tika veikta, izmantojot ekstrahētus DNS un RNS paraugus no 41 FFPE audu parauga un 1 FFPE šūnu līnijas (katram no tiem tika izmantots 1 FFPE audu paraugs un FFPE šūnu līnija, lai no katra izveidotu 2 paneļa komponentus). Audu paraugi sastāvēja no šādiem veidiem: urīnpūslis, kauli, smadzenes, krūtis, resnā zarna, tukšā zarna, nieres, aknas, plaušas, olnīcas, prostata, āda, mīkstie audi, kuņģis, vairogdziedzeris un dzemde. Kopā tika testēti 44 paneļa komponenti, tostarp DNS paneļa komponenti ar maziem DNS variantiem (SNV, MNV, insercijām un delēcijām), gēnu amplifikācijām, dažādiem TMB rādītājiem, augstiem MSI rādītājiem un RNS paneļa komponenti ar saplūšanām un salaidumu variantiem. Lielākajai daļai paneļa komponentu bija zināms, ka mērķa variantu līmenis aptuveni 2–3 reizes pārsniedza variantam specifisko noteikšanas robežu (~2–3 × LoD).

LoD ir analīta koncentrācija, pie kuras novērotie analīzes rezultāti ir pozitīvi (variants noteikts attiecībā pret TSO Comprehensive (EU) analīzes robežvērtību) ≥ 95 % gadījumu. Novērotie variantu vidējie līmeņi tika klasificēti kā aptuveni < 2 × LoD (novēroti variantu līmeņi < 1,5 × LoD), ~2–3 × LoD (novēroti variantu līmeņi no 1,5 × LoD līdz 3,4 × LoD) un aptuveni > 3 × LoD (novēroti variantu līmeņi > 3,4 × LoD).

PPC maziem DNS variantiem, gēnu amplifikācijai, augstam MSI-High līmenim un RNS variantiem tika aprēķināti, apvienojot novērojumus sekvencēšanas izpildēs un centros. Līdzīgi PNC gadījumi tika aprēķināti maziem DNS variantiem, gēnu amplifikācijai un RNS variantiem. Katram zināmajam mērķa variantam TSO Comprehensive (EU) analīzes novērojumi tā paša varianta tipa paneļa komponentos, bet kas satur citus variantus, kuri nav atvasināti no tā paša avota parauga un kuri arī neatbilst vairākuma noteikumam šim variantam (< 50 % no noteikšanas gadījumiem pozitīvi), tika apvienoti testēšanai dažādos centros, ar dažādiem operatoriem/instrumentiem, dažādās dienām, ar dažādām reaģentu partijām un sekvencēšanas izpildēm, lai aprēķinātu PNC. Divpusējos 95 % ticamības intervālus (TI) aprēķināja, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

Mazie DNS varianti

59. tabula parādīti mērķa mazo DNS variantu PPC. PPC bija diapazonā no 91,3 % BRAF SNV līdz 100 % lielākajai daļai mazo DNS variantu.

59. tabula PPC TSO Comprehensive (EU) analīzes mazo DNS variantu noteikšanai PPC kombinētajos mērķa paneļa komponentos

Novērotais varianta līmenis ¹	Varianta tips	Mērķa variants (nukleotīds)	Mērķa variants (aminoskābe)	Vidējais VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % TI ³
~2-3x LoD	DELĒCIJA	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2-3x LoD	DELĒCIJA	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERCIJA	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
~2-3x LoD	INSERCIJA	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0 %)
< 2x LoD	INSERCIJA	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2-3x LoD	DELĒCIJA	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	DELĒCIJA	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0 %, 100,0)

Novērotais varianta līmenis ¹	Varianta tips	Mērķa variants (nukleotīds)	Mērķa variants (amino-skābe)	Vidējais VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 % TI ³
~2-3x LoD	INSERCIJA	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	INSERCIJA	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	DELĒCIJA	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	INSERCIJA	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	INSERCIJA	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Varianta līmenis aprēķināts, izmantojot vidējo novēroto variantu alēles biežumu.

² Vidējais variantu alēles biežums aprēķināts no novērotajiem analīzes rezultātiem.

³ Divpusējo 95 % ticamības intervālu aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

PNC bija 100 % visos mazajos DNS variantos.

60. tabula parādīta dispersijas komponenta analīze VAF rezultātiem katram variācijas avotam un kopējās variācijas visiem paneļa komponentiem ar mērķa mazajiem DNS variantiem.

60. tabula VAF dispersijas komponentu analīze mērķa mazajiem DNS variantiem

Mērķa variants (nukleotīds)	N	Vidējais VAF	Centra SD (%CV)	Operatora (centra) SD (%CV)	Dienas (centra, operatora) SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Izpildes SD (%CV)	Kopējā 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)

Bija divi mazi DNS mērķa varianti, kuriem novērojumu skaits bija pārāk mazs, lai piemērotu dispersijas komponentu modeli. Šiem diviem mērķa variantiem kopējā SD bija 0,027 variantam chr1_27024001_C_CG un 0,001 variantam chr17_7578470_C_CGGCGG.

Gēnu amplifikācija

61. tabula parādīti PPC mērķa gēnu amplifikācijai. PPC bija 100,0 % attiecībā uz MET un 100,0 % attiecībā uz ERBB2.

61. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes gēnu amplifikāciju noteikšanai PPC kombinētajos mērķa paneļa komponentos

Novērotais varianta līmenis ¹	Mērķa variants	Novērotā vidējā izmaiņu attiecība ²	Procentuālie pozitīvie noteikšanas gadījumi (%)	95 % TI 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 Variantu līmenis aprēķināts pēc vidējās novērotās izmaiņu attiecības.

² Vidējā izmaiņu attiecība aprēķināta pēc novērotajiem analīzes rezultātiem.

³ Divpusējo 95 % ticamības intervālu aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

PNC bija 100 % visās gēnu amplifikācijās.

62. tabula parādīta izmaiņu attiecības rezultātu dispersijas komponenta analīze katram variācijas avotam un kopējās variācijas visiem paneļa komponentiem ar mērķa gēnu amplifikāciju.

62. tabula Izmaiņu attiecības dispersijas komponentu analīze mērķa gēnu amplifikācijām

Mērķa variants	N	Vidējā izmaiņu attiecība	Centra SD (%CV)	Operatora (centra) SD (%CV)	Dienas (centra, operatora) SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Izpildes SD (%CV)	Kopējā 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

63. tabula parādīti PPC mērķa MSI-High paneļa komponentiem. PPC bija 100 % abiem MSI-High paneļa komponentiem.

63. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes MSI-High statusa noteikšanai PPC kombinētajos mērķa paneļa komponentos

Paneļa komponents	Vidējais MSI rādītājs ¹	N	Procentuālie pozitīvie noteikšanas gadījumi (%)	95 % TI 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)
Visi komponenti		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Vidējais novērotais MSI rādītājs aprēķināts no novērotajiem analīzes rezultātiem.

² Divpusējo 95 % ticamības intervālu aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

64. tabula parādīta MSI rādītāja rezultātu dispersijas komponenta analīze katram variācijas avotam un kopējās variācijas visiem paneļa komponentiem ar mērķa MSI-High statusu.

64. tabula Dispersijas komponentu analīze MSI rādītājam mērķa MSI-High paneļa komponentiem

Paneļa komponents	N	Vidējais MSI rādītājs	Centra SD (%CV)	Operatora (centra) SD (%CV)	Dienas (centra, operatora) SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Izpildes SD (%CV)	Kopējā 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

Lai novērtētu TMB rezultātu atkārtojamību, tika veikta rezultāta kvantitatīvā analīze mērķa TMB paneļa komponentiem, kas atainoja paredzamo TMB rezultātu diapazonu. 65. tabula parādīta TMB rezultātu dispersijas komponenta analīze katram variācijas avotam un kopējās variācijas TMB paneļa komponentiem. Kopējā TMB rādītāja SD bija 1,0 (%CV = 13) vienam paneļa komponentam (vidējais TMB rādītājs = 7,6) un 1,1 (%CV = 2) citam paneļa komponentam (vidējais TMB rādītājs = 63,2).

65. tabula Dispersijas komponentu analīze TMB rādītājam mērķa TMB paneļa komponentiem

Paneļa komponents*	N	Vidējais TMB rādītājs	Centra SD (%CV)	Operatora (centra) SD (%CV)	Dienas (centra, operatora) SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Izpildes SD (%CV)	Kopējā 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)

* Bija 1 TMB paneļa komponents, kuram novērojumu skaits bija pārāk mazs (N = 2), lai varētu piemērot dispersijas komponentu modeli. Šim paneļa komponentam kopējā SD bija 1,7.

RNS varianti

66. tabula parādīti mērķa RNS variantu PPC. PPC bija robežās no 91,7 % KIF5B-RET līdz 100 % lielākajai daļai RNS variantu.

66. tabula TSO Comprehensive (EU) analīzes RNS variantu noteikšanai PPC kombinētajos mērķa paneļa komponentos

Novērotais varianta līmenis ¹	Varianta tips	Mērķa variants	Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs ²	PPC (%) (n/N)	95 % TI ³
> 3x LoD	Saplūšana	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Saplūšana	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Saplūšana	CD74-ROS1; GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Saplūšana	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Saplūšana	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Saplūšana	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Saplūšana	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3 x LoD	Saplūšana	DHX8;ETV4- STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Saplūšana	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Saplūšana	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Saplūšana	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Saplūšana	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Saplūšana	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Saplūšana	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
Saplūšana	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)	
< 2x LoD	Saplūšana	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Saplūšana	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3x LoD	Salaiduma variants	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2-3x LoD	Salaiduma variants	MET 14. eksona izlaišana	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Varianta līmenis aprēķināts no novērotajiem vidējiem atbalstītajiem nolasījumiem.

² Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs, kas aprēķināts no novērotajiem analīzes rezultātiem.

³ Divpusējo 95 % ticamības intervālu aprēķina, izmantojot Vilsona vērtējuma metodi.

PNC bija 100 % katram mērķa RNS variantam, izņemot FGFR2-SRPK2 saplūšanu (PNC = 99,60 % (984/988); 95 % TI: no 98,96 % līdz 99,84 %).

67. tabula parādīta dispersijas komponenta analīze atbalstītajiem nolasījumiem katram variācijas avotam un kopējās variācijas visiem paneļa komponentiem ar mērķa RNS variantiem.

67. tabula Atbalstīto nolasījumu dispersijas komponentu analīze mērķa RNS variantiem

Mērķa variants	N	Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs	Centra SD (%CV)	Operatora (centra) SD (%CV)	Dienas (centra, operatora) SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Izpildes SD (%CV)	Kopējā 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 salaiduma variants	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET 14. eksona izlaišanas salaiduma variants	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Laboratorijas iekšējā precizitāte

Tika veikti divi pētījumi, lai novērtētu laboratorijas iekšējo precizitāti ar TSO Comprehensive (EU). 1. pētījumā tika novērtētas NTRK un RET saplūšanas un RET mazie DNS varianti. 2. pētījumā tika novērtēta TMB un MSI.

1. pētījums

Laboratorijas iekšējā precizitāte tika novērtēta NTRK1–3 saplūšanai (zemākas pakāpes glioma, multiformā glioblastoma, miofibroblastiskā sarkoma, krūts dziedzeru vēzis), RET saplūšanai (vairogdziedzera vēzis un ādas audi no nezināma vēža) un RET nelieliem DNS variantiem (medulārais vairogdziedzera vēzis) ar FFPE audiem no norādītajiem vēžiem. Katrs paraugs tika testēts divos variantu līmeņos: ~1 x LoD (zems variantu līmenis) un ~2–3 x LoD (augsts variantu līmenis), izņemot paraugu, kas saturēja CCDC6-RET, kas tika testēts tikai ar zemu variantu līmeni. Katrs paraugs katrā testa līmenī tika pārbaudīts divos eksemplāros katrā bibliotēkas sagatavošanas notikumā, ko izpildīja trīs (3) operatori. Katrs operators sāka bibliotēkas sagatavošanu trīs (3)

darba sākuma dienās, kas nebija secīgas, un sekvencēja ar trīs (3) noteiktiem NextSeq 550Dx instrumentiem. Trīs (3) reaģentu partijas tika testētas, radot 54 novērojumus katram līmenim. Dažiem līmeņiem bija mazāk nekā 54 novērojumi nederīgu bibliotēku dēļ.

Kvalitatīvā analīze

Variantu noteikšanas kvalitatīvā atbilstība tika novērtēta atsevišķi diviem varianta līmeņiem konkrētajam variantam no apkopotajiem novērojumiem ar visiem mainīgajiem (operatori, reaģentu partijas, instrumenti, dienas un atkārtojumi). PPC un PNC, kā arī saistītais abpusējais 95 % ticamības intervāls (Vilsona rādītājs) ir apkopoti [68. tabula](#) (mazie DNS varianti) un [69. tabula](#) (RNS saplūšanas).

Pie augsta variantu līmeņa (~2–3 x LoD) TSO Comprehensive (EU) analīze uzrādīja 100 % PPC un PNC visiem testētajiem variantiem.

Pie zema variantu līmeņa (~1 x LoD) PPC maziem DNS variantiem svārstījās no 83,3 % līdz 98,1 % un PPC RNS saplūšanai svārstījās no 90,7 % līdz 100 %. Variantiem ar PPC < 95 % vidējais VAF (RET C634Y un RET D898_E901del) vai atbalstītie nolasījumi (NCOA4-RET un BCAN-NTRK1) bija zem attiecīgajām noteikšanas robežvērtībām. Pie zema variantu līmeņa 100 % PNC tika sasniegts visiem variantiem.

68. tabula Mērķa DNS variantu kvalitatīvie rezultāti

Varianta līmenis	Variants	Varianta tips	Vidējais 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	DELĒCIJA	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*	DELĒCIJA	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Varianta līmenis	Variants	Varianta tips	Vidējais 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	DELĒCIJA	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*	DELĒCIJA	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Nukleotīdu izmaiņas katram variantam ir uzskaitītas sadaļā Noteikšanas robežvērtība, izņemot RET D631_L633delinsE, kas ir 10. hromosoma, pozīcija 43609940, atsauce ACGAGCT, alternatīva A.

69. tabula Mērķa RNS saplūšanas kvalitatīvie rezultāti

Varianta līmenis	Saplūšana	Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs	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 šūnu līnija)	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. paraugs)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (2. paraugs)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Varianta līmenis	Saplūšana	Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs	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 šūnu līnija)	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	Nav	Nav testēts	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (1. paraugs)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (2. paraugs)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kvalitatīvā analīze

Tika veikta ierobežotas maksimālās varbūtības (REML) dispersijas komponentu analīze, lai novērtētu pamata nepārtrauktā mainīgā (VAF maziem DNS variantiem un atbalstīti nolasījumi RNS saplūšanai) kopējās variācijas un novērtētu precizitātes komponentus (standartnovirzi (SD), variācijas koeficientu (CV)) katram variācijas avotam (operatoriem, instrumentiem, dienām, reaģentu partijām, atlikumam un kopumam). Rezultāti ir parādīti [70. tabula](#) maziem DNS variantiem un [71. tabula](#) RNS saplūšanai.

VAF atšķirība palielinājās ar vidējo, kā paredzēts binārai proporcijai. Atbalstīto nolasījumu atšķirības palielinājās ar vidējo vērtību, kā paredzēts, izmantojot skaita datus. Atlikuma komponents bija lielākais kopējās izkliedes veicinātājs gan maziem DNS variantiem, gan RNS saplūšanai abos līmeņos, atbalstot secinājumu, ka šo variantu noteikšana ar TSO Comprehensive (EU) ir noturīga attiecībā uz operatoriem, partijām, instrumentiem un dienām.

70. tabula Kvantitatīvie SD un CV rezultāti mērķa mazajiem DNS variantiem

VAF līmenis	Variants	Varianta tips	N derīgie mēģinājumi	Vidējais VAF	Operatora SD (%CV)	Instrumenta SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Dienas SD (%CV)	Atlikumu SD (%CV)	Kopējā SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	DELĒCIJA	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	DELĒCIJA	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	DELĒCIJA	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	DELĒCIJA	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. tabula Kvantitatīvie SD un CV rezultāti mērķa RNS saplūšanām

Atbalstīto nolasījumu līmenis	Saplūšana	N derīgie mēģinājumi	Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs	Operatora SD (%CV)	Instrumenta SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Dienas SD (%CV)	Atlikumu SD (%CV)	Kopējā 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 (šūnu līnija)	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. paraugs)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 % (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (2. paraugs)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Atbalstīto nolasījumu līmenis	Saplūšana	N derīgie mēģinājumi	Atbalstīto nolasījumu vidējais rādītājs	Operatora SD (%CV)	Instrumenta SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Dienas SD (%CV)	Atlikumu SD (%CV)	Kopējā 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 (šūnu līnija)	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. paraugs)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (2. paraugs)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

2. pētījums

Laboratorijas iekšējā precizitāte tika novērtēta attiecībā uz TMB un MSI. Lai novērtētu precizitāti dažādos līmeņos ar plašu rezultātu diapazonu, tika izmantoti pieci NSŠPV FFPE DNS paraugi TMB un septiņi KRV FFPE paraugi MSI, tostarp gan MS-Stable, gan MSI-High. Katrs no paraugiem tika pārbaudīts divos eksemplāros, to veicot trīs (3) operatoriem trīs (3) dienās ar trīs (3) bibliotēku sagatavošanām, izmantojot trīs (3) reaģentu partijas un trīs NextSeq 550Dx instrumentus, kas radīja 54 novērojumus vienā līmenī.

MSI statusam tika novērtēta kvalitatīvā atbilstība. TSO Comprehensive (EU) analīze uzrādīja MSI statusa 100 % atbilstību procentuāliem pozitīviem un procentuāliem negatīviem noteikšanas gadījumiem. Attiecībā uz TMB TSO Comprehensive (EU) analīze ziņo TMB rezultātu; kvalitatīvā atbilstība nav piemērojama.

Kopējā TMB un MSI rādītāju variācija kopā ar ieguldījumu pēc avota (instrumentiem, operatoriem, partijām, dienām un atlikumiem) tika kvantificēta, izmantojot dispersijas komponentu modeli dažādiem rādītājiem. Standarta novirze (SD) un variācijas koeficients (CV), kas atbilst TMB, ir parādīts 72. tabula un, kas atbilst MSI, ir parādīts 73. tabula pēc līmeņa. Dažiem līmeņiem bija mazāk nekā 54 novērojumi nederīgu bibliotēku dēļ.

72. tabula Kvantitatīvie TMB rādītāju SD un CV rezultāti

Līmenis	Vidējais TMB rādītājs	N derīgie mēģinājumi	Operatora SD (%CV)	Instrumenta SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Dienas SD (%CV)	Atlikumu SD (%CV)	Kopējā SD (%CV)
L1	0,3	52	0,00 (0)	0,06 (23)	0,00 (0)	0,08 (30)	0,40 (146)	0,41 (151)
L2	8,4	53	0,00 (0)	0,14 (2)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,71 (8)	0,73 (9)
L3	15,1	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,20 (1)	0,00 (0)	1,16 (8)	1,18 (8)
L4	20,3	53	0,00 (0)	0,00 (0)	0,06 (0)	0,00 (0)	0,56 (3)	0,57 (3)
L5	42,3	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,15 (0)	0,00 (0)	1,37 (3)	1,38 (3)

73. tabula Kvantitatīvie MSI rādītāju SD un CV rezultāti

MSI statuss	Līmenis	Vidējais MSI rādītājs (%)	N derīgie mēģinājumi	Operatora SD (%CV)	Instrumenta SD (%CV)	Partijas SD (%CV)	Dienas SD (%CV)	Atlikumu SD (%CV)	Kopējā SD (%CV)
MS-Stable	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-High	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

TMB rādītāju atšķirības mēdz pieaugt ar vidējo vērtību, kā paredzēts datu uzskaites teorētiskajās izklaidēs. MSI rādītāju atšķirības līmeņiem tuvu MSI rādītājam, kas ir 50, ir lielākas nekā MSI rādītāju variācijas, kas ir tuvākas 0 vai 100, kas atbilst proporcionālu datu teorētiskajām izklaidēm. Atlikuma komponents joprojām bija lielākais kopējās novirzes veicinātājs gan MSI, gan TMB rādītājiem, atbalstot secinājumu, ka rādītāji ir noturīgi attiecībā pret operatoriem, partijām, instrumentiem un dienām. Tomēr gan MSI, gan TMB ir sarežģīti biomarkieri un to analītiskā veiktspēja dažādiem paraugiem var atšķirties. Tas nozīmē, ka TMB variācijas ir atkarīgas ne tikai no TMB vērtības, bet arī no variantu sastāva paraugā, piemēram, varianta veida (SNV, indels) un VAF līmeņa (tuvums iekļaušanas robežvērtībai). Tāpat MSI variācijas ir atkarīgas ne tikai no MSI vērtības, bet arī no izlasē esošo vietu sastāva, piemēram, nestabilo vietu skaita un nestabilitātes apjoma katrā vietā.

C5 un C95 vērtības ap 20,00 % robežu tika noteiktas MSI, izmantojot precīzu profilu (74. tabula).

74. tabula C5-C95 MSI intervāli

Rādītājs	C5	C95
MSI	17,17 %	23,32 %

Tika novērtēta audzēja satura ietekme uz TMB un MSI rādītājiem. Lielākajai daļai paraugu audzēja saturs $\geq 30\%$ nebūtiski ietekmēja TMB rādītājus virs aptuveni 10 mutācijām uz megabāzi. Palielinoties audzēja saturam, TMB rādītāji saglabājās salīdzinoši nemainīgi. MSI-High paraugiem audzēja saturs uzrādīja pozitīvu, lineāru korelāciju ar MSI rādītāju. MSI-High paraugiem saglabājās vidēji MSI-High, kad audzēja saturs bija $\geq 30\%$. Endometrija paraugi uzvedās atšķirīgi no citiem audu veidiem, un tika konstatēts, ka nepieciešams lielāks audzēja satura daudzums, lai noteiktu MSI-High.

Audzēja profilēšanas precizitāte

Variantu noteikšana ar TSO Comprehensive (EU) analīzi tika salīdzināta ar atsauces metožu rezultātiem. DNS mazie varianti un TMB tika salīdzināti ar ārēju apstiprinātu visa eksoma NGS metodi. Gēnu amplifikācijas tika salīdzinātas ar to pašu visa eksoma NGS metodi vai validēto duālo in situ hibridizācijas (DISH) metodi HER2 amplifikācijām. MSI tika novērtēta, izmantojot apstiprinātu MSI-PCR testu. RNS salaidumu varianti tika salīdzināti ar apstiprinātu kvantitatīvu PCR (qPCR) metodi. ROS1 un ALK saplūšanas tika salīdzinātas ar apstiprinātām FISH analīzēm. Visi pārējie saplūšanas gadījumi tika salīdzināti ar kombinētu metodi, kas sastāvēja no apstiprinātas RNS pilna eksoma NGS analīzes (RNGS1), mērķa NGS paneļa (RNGS2) un pilienu digitālās PCR (ddPCR).

Mazo DNS variantu noteikšana

Mazo DNS variantu noteikšana ar TSO Comprehensive (EU) analīzi tika salīdzināta ar visa eksoma sekvencēšanas (WES) rezultātiem, kas izmanto WES ar saskaņotiem audzēja normālo paraugu pāriem dzimumšūnu un somatisko mazo variantu noteikšanai. Salīdzinājums starp mazajiem variantiem, kas sastāvēja no viena nukleotīda variantiem (SNV), insercijām un delēcijām, tika balstīts uz 124 paraugiem no 14 dažādiem audu veidiem, kas bija derīgi gan TSO Comprehensive (EU), gan WES. TSO Comprehensive (EU) var, bet WES analīze nevar noteikt vairāku nukleotīdu variantus (MNV, 2–3 bāžu pāri), kuriem nepieciešama fāzēšana. TSO Comprehensive (EU) MNV tika novērtēti kā atsevišķi SNV, salīdzinot ar WES. Visu variantu noteikšanas gadījumu atbilstības kopsavilkums variantu līmenī, tostarp pozitīvā procentuālā sakritība (PPA) un negatīvā procentuālā sakritība (NPA), ir parādīts [75. tabula](#).

75. tabula Atbilstības kopsavilkums mazo variantu noteikšanas gadījumiem, kas novērtēti pēc dzimumšūnu vai somatiskā statusa

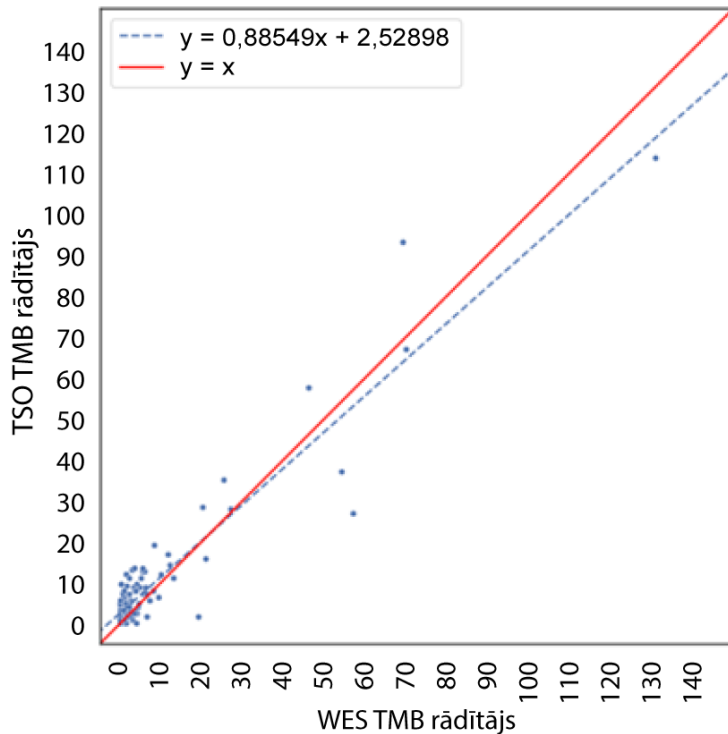
	Noteiktais somatiskais ar WES	Noteiktais dzimumšūnu ar WES	Nav noteikts ar WES
Noteikts ar TSO Comprehensive (EU)	382	33,163	426
Nav noteikts ar TSO Comprehensive (EU)	69	61	70,000,481
Kopā	451	33,224	70,000,907
Procentuālā sakritība	PPA: 85 % (382/451), 95 % TI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33 163/33 224) 95 % TI: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70 000 481/70 000 907) 95 % TI: [99,999 %, 99,999 %]

Kopumā TSO Comprehensive (EU) noteica 426 variantus, kas netika noteikti ar WES metodi. Divsimtčetriem (48 %) no šiem variantiem varianta alēles biežums bija zemāks par WES metodes noteikšanas sliekšni. No atlikušajiem potenciālajiem kļūdaini pozitīvajiem variantiem ar WES metodi bija pierādījumi par variantu noteikšanu ar zemu atbalstu. Daudziem variantiem bija arī ļoti zema līmeņa WES pierādījumi ar saskaņotajiem normālajiem paraugiem. Šis rezultāts liecina, ka WES šos audzēja variantus nenoteica audzēja normāla piesārņojuma dēļ.

Audzēja mutāciju slodzes noteikšana

TMB atbilstība tika noteikta, salīdzinot TMB rādītājus (somatiskās mutācijas/megabāzes) starp WES metodi un TSO Comprehensive (EU) 124 paraugiem ar pieejamiem datiem gan no TSO Comprehensive (EU), gan no WES. Lineārās regresijas analīzei ar WES kā prognozētāju krustojšanās ar Y asi bija 2,53, slīpums 0,89 un Pīrsona korelācijas koeficients 0,94 (3. attēls).

3. attēls TMB rezultāta korelācija starp WES un TSO Comprehensive (EU)



Gēnu amplifikācijas noteikšana

Gēnu amplifikācijas noteikšana ar TSO Comprehensive (EU) analīzi tika salīdzināta ar tās pašas WES analīzes rezultātiem, izmantojot audzēja normālos saskaņotos paraugus vai tikai audzēja paraugus. Kopumā bija 420 paraugi, no kuriem 183 izmantoja ortogonālo audzēja normālo metodi un 237 izmantoja tikai audzēja metodi. No 420 paraugiem pētījumam tika atlasīti 50 paraugi, jo tie bija amplifikācijas pozitīvi ar TSO Comprehensive (EU) vai priekštestes testu. Šo raksturoto paraugu veikspēja tika koriģēta, izmantojot vidējo saplūšanas izplatību. Kombinētā veikspēja raksturotajos un neraksturotajos paraugos izmantoja apgrieztās novirzes svērto vidējo vērtību. Paraugi bija no 14 audu veidiem un saturēja amplifikācijas no 55 gēniem. TSO Comprehensive (EU) ziņo gēnu amplifikācijas no MET un ERBB2 gēniem. Tomēr precizitāte tika novērtēta visiem 55 gēniem. Gēnu amplifikācijas noteikšanas gadījumu kopsavilkums ir parādīts 76. tabulā.

76. tabula Gēnu amplifikāciju saskaņotības kopsavilkums

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

* Uzticamības intervāls aprēķināts ar bootstrap.

ERBB2 (HER2) amplifikācijas kuņģa un krūts audos tika analizētas atsevišķi no citiem gēnu amplifikācijas veidiem, izmantojot duālu in situ hibridizācijas metodi (DISH). Kopumā tika testēti 116 krūts un kuņģa paraugi, no kuriem 64 iepriekš ar IHC vai ar FISH bija raksturoti kā HER2 pozitīvi. Vienam paraugam ekstrakcija neizdevās, 4 paraugiem neatbilda derīgums TSO Comprehensive (EU), un 3 paraugiem neatbilda derīgums DISH analīzei. No 108 paraugiem 20 (18,5 %) bija robežlīnijas rezultāti (no 1,5 līdz 2,5), kas bija tuvu DISH robežai 2,0. Atbilstības rezultāti, tostarp PPA, NPA visiem paraugiem, izņemot robežlīnijas HER2 DISH gadījumus, ir parādīti [77. tabula](#).

77. tabula Atbilstības kopsavilkums starp TSO Comprehensive un HER2 DISH, tostarp HER2 gēna amplifikācijai

HER2 gēna amplifikācija Visi (krūts un kuņģa)	HER2 DISH amplificēti	HER2 DISH nav amplificēti
Pozitīvi ar TSO Comprehensive (EU)	17 (ieskaitot 1 uz robežlīnijas)	13 (ieskaitot 1 uz robežlīnijas)
Negatīvi ar TSO Comprehensive (EU)	10 (ieskaitot 6 uz robežlīnijas)	68 (ieskaitot 12 uz robežlīnijas)
Procentuālā sakritība, ieskaitot robežlīnijas gadījumus	PPA: 63 % (17/27) 95 % TI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % TI: [74 %, 90 %]
Procentuālā sakritība, izņemot robežlīnijas gadījumus	PPA: 80 % (16/20) 95 % TI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % TI: [72 %, 90 %]

Mikrosatelīta nestabilitātes noteikšana

Mikrosatelīta nestabilitātes noteikšana ar TSO Comprehensive (EU) analīzi tika salīdzināta ar validēta MSI-PCR testa rezultātiem, kas testēšanai izmanto audzēja normālos saskaņotos paraugus. Kopumā tika salīdzināti 195 paraugi, kas atbilst audzēja satura prasībām ≥ 30 % (MS-Stable statusam) un pārstāv 14 audu veidus. MSI-PCR novērtē 5 vietas un tam ir 3 rezultāti — MSI-Stable (nav nestabilu vietu), MSI-Low (MSI zems) (viena nestabila vieta) un MSI-High (divas vai vairāk nestabilas vietas). TSO Comprehensive (EU) novērtē līdz 130 mikrosatelītu vietām un klasificē paraugus tikai kā MS-Stable vai MSI-High (≥ 20 % nestabilas vietas). MSI-PCR rezultātiem MSI-Low tika grupēti ar MS-Stable. Atbilstības analīze ir parādīta [78. tabula](#).

78. tabula Analīzes atbilstības kopsavilkums starp TSO Comprehensive (EU) un MSI-PCR saistībā ar DNS mikrosatelītu nestabilitāti

MSI statuss	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSI stabils
TSO Comprehensive (EU) Nestabils (MSI-High)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabils (MS-Stable)	3	0	150
Kopā	44	2	150
Procentuālā sakritība	PPA: 93 % (41/44) 95 % TI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % TI: [95 %, > 99 %]	

RNS salaidumu variantu noteikšana

Salaidumu variantu noteikšanas precizitāte tika aprēķināta, salīdzinot TSO Comprehensive (EU) rezultātus ar qPCR analīzēm mutācijām EGFRvIII un MET 14. eksona izlaišanu, ietverot vienu zināmu pozitīvu RNS katram salaidumu variantam. Atbilstības analīze tika veikta kopumā 230 unikāliem FFPE RNS paraugiem no 14 audu veidiem, un bija pieejami gan TSO Comprehensive (EU), gan atsauces metodes dati. Visiem paraugiem tika testēta mutācija MET 14. eksona izlaišanai, bet mutācija EGFRvIII tika testēta tikai smadzeņu audos. Trīs paraugiem, kuriem pozitīvu MET 14. eksona izlaišanu noteica qPCR, bet nenoteica TSO Comprehensive (EU), bija vidējā Ct > 37, un tie bija zem TSO Comprehensive (EU) LoD līmeņa. 79. tabula apkopoti atbilstības pētījuma rezultāti.

79. tabula Atbilstības kopsavilkuma analīze starp TSO Comprehensive (EU) un qPCR analīzi RNS salaidumu variantiem

RNS salaidumu varianti	Pozitīvs ar qPCR	Negatīvs ar qPCR
Pozitīvi ar TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	3	0
Negatīvi ar TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	0	13
Pozitīvi ar TSO Comprehensive (EU) (MET 14. eksona izlaišana)	1	0
Negatīvi ar TSO Comprehensive (EU) (MET 14. eksona izlaišana)	3	217
Kopā	7	230
Procentuālā sakritība	PPA: 57 % (4/7) 95 % TI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % TI: [98 %, 100 %]

RNS saplūšanas noteikšana

Salīdzinājums ar salikto metodi

TSO Comprehensive (EU) saplūšanas tika salīdzinātas ar salikto metodi, kas sastāvēja no RNS pilnas eksoma sekvenčēšanas, izmantojot NGS paneli (RNGS1), mērķa NGS saplūšanas paneli (RNGS2) un pilienu digitālās PCR (ddPCR).

RNGS1 metode pārklājas ar visiem gēniem, kuriem TSO Comprehensive (EU) var noteikt saplūšanas. Tomēr RNGS1 metodes noteikšanas robeža bija 4X–8X, salīdzinot ar TSO Comprehensive (EU), pamatojoties uz atbalstošu nolasījumu skaitu, kas novēroti pārklājošas saplūšanas noteikšanas gadījumos. Līdz ar to kopā ar WES (RNGS1) metodi tika izmantota salikta metode, kurā izmanto divas papildu metodes ar lielāku jutīgumu, bet mazāku platumu saplūšanai.

Kopā ar RNGS1 tika testēti 255 unikāli RNS paraugi, kas pārstāvēja 14 audu veidus un atbilda TSO Comprehensive (EU) parametriem. Divi paraugi RNGS1 parauga kvalitātes kontrolei bija nederīgi un tika izslēgti no papildu analīzes. No 82 saplūšanām, ko noteica TSO Comprehensive (EU), 4 tika izslēgtas no izvērtēšanas RNGS1 parauga kvalitātes kontroles kļūmju dēļ, un 7 papildu saplūšanas nebija nosakāmas, jo RNGS1 panelī nebija mērķu. No atlikušajām 71 saplūšanām, ko noteica TSO Comprehensive (EU), RNGS1 apstiprināja 9 saplūšanas. RNGS1 noteica 4 saplūšanas gadījumus, kurus nenoteica TSO Comprehensive (EU).

No 62 saplūšanas gadījumiem, kas bija TSO Comprehensive (EU) pozitīvi un ko nenoteica RNGS1, 13 pārklājās un tos apstiprināja RNGS2. Vienu saplūšanu noteica RNGS2, bet nenoteica TSO Comprehensive (EU).

Pēc tam saplūšanām, ko noteica TSO Comprehensive (EU), nenoteica vai kas nebija nosakāmas ar RNGS1 un kas nebija novērtējamas ar RNGS2 (49), tika izmantota pilienu digitālā PCR. Turklāt ddPCR tika izmantota, lai atkārtoti novērtētu 2 no 4 kļūdaini negatīviem saplūšanas gadījumiem ar TSO Comprehensive (EU), izmantojot RNGS1, un 2 no 9 atbilstīgām saplūšanas reizēm ar TSO Comprehensive (EU) un RNGS1. Lai nodrošinātu specifiskumu, katra pozitīvā saplūšanas parauga testēšanai tika iekļauti pieci negatīvi saplūšanas paraugi. Astoņpadsmit saplūšanas netika testētas ar ddPCR, jo nebija iespējams izveidot praimerus/zondes, bija vairāki gēnu partneri saplūšanai vai bija nepietiekams atlikušā FFPE materiāla daudzums. ddPCR gadījumā praimeru un zondes tika veidoti pret novērotajiem TSO Comprehensive (EU) analīzes pārrāvumiem.

Kopumā ddPCR noteica 52 saplūšanas, 41 no šiem saplūšanas gadījumiem noteica TSO Comprehensive (EU), bet tos nenoteica vai tie nebija nosakāmi ar RNGS1. Deviņas saplūšanas, ko noteica ddPCR, bija negatīvas ar TSO Comprehensive (EU) vai RNGS1. Divas ddPCR pozitīvās saplūšanas apstiprināja 2 atbilstīgas saplūšanas ar TSO Comprehensive (EU) un RNGS1. ddPCR nekonstatēja saplūšanu 2 atkārtoti novērtētajiem TSO Comprehensive (EU) kļūdaini negatīviem rezultātiem ar RNGS1, tomēr tie tika uzskatīti par kļūdaini negatīviem, pamatojoties uz RNGS1 salīdzinājumu.

No 255 paraugiem pētījumam tika atlasīti 35 paraugi, jo tie bija saplūšanas pozitīvi ar TSO Comprehensive (EU) vai priekštecē analīzi. Šo raksturoto paraugu veikspēja tika koriģēta, izmantojot vidējo saplūšanas izplatību. Kombinētā veikspēja raksturotajos un neraksturotajos paraugos izmantoja apgrieztās novirzes svērto vidējo vērtību. Kombinētās atbilstības rezultātu saplūšanām ir parādītas [80. tabula](#).

66 saplūšanas gadījumi (54 unikālas saplūšanas) ar atbilstību saliktajai metodei pārstāvēja 43 gēnus TSO Comprehensive (EU) panelī. Saplūšanas ir piemērotas pārskatam par 23 gēniem, kas norādīti [80. tabula](#).

80. tabula RNS saplūšanas konkordances kopsavilkums

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

* Uzticamības intervāls aprēķināts ar bootstrap.

Saīdinājums ar FISH metodi ROS1 un ALK saplūšanām

Divdesmit piecus NSŠPV paraugus testēja ar FISH gan ROS1, gan ALK saplūšanai, un attiecīgi 5 papildu NSŠPV paraugiem tika testētas ROS1 saplūšanas. Astoņiem paraugiem FISH attiecībā uz ROS1 neizdevās nepiemērotu audu dēļ. Divas ROS1 un vienu ALK saplūšanu konstatēja gan TSO Comprehensive (EU), gan FISH. Netika novēroti neatbilstīgi rezultāti. [81. tabula](#) apkopoti atbilstības rezultāti TSO Comprehensive (EU) un FISH metodei ROS1 un ALK saplūšanām.

81. tabula Atbilstības rezultātu kopsavilkums ar TSO Comprehensive (EU) un FISH metodi ROS1 un ALK saplūšanām

ALK+ROS1	Pozitīva ar FISH	Negatīva ar FISH
Pozitīvi ar TSO Comprehensive (EU)	3	0
Negatīvi ar TSO Comprehensive (EU)	0	44
Kopā	3	44
Procentuālā sakritība	PPA: 100 % (3/3) 95 % TI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % TI: [92 %, 100 %]

Parauga derīgums

Parauga derīgums (pirmais mēģinājums) tika mērīts 181 unikālam RNS un 272 unikāliem DNS paraugiem no FFPE blokiem, kuru vecums bija ≤ 5 gadi. Šie paraugi tika atlasīti, pamatojoties uz audu veidu un pieejamo materiālu; analīzes derīgums nebija zināms. Bibliotēkas kvalitātes kontroles parametriem ir jāatbilst varianta veidam, lai to uzskatītu par derīgu. Paraugu derīgums tika novērtēts atsevišķi katram variantu veidam (mazie DNS varianti/TMB, MSI, gēnu amplifikācijas, saplūšanas/salaidumu varianti) un ir parādīts [82. tabula](#). Tiek prognozēts papildu MSI derīguma samazinājums par 1 % FFPE blokiem ≤ 2 gadu vecumā reaģentu transportēšanas dēļ.

82. tabula Parauga derīgums

Varianta tips	Parauga derīgums
Saplūšanas/salaidumu varianti (RNS)	76 %
Mazie DNS varianti/TMB	75 %
MSI	72 %
Gēnu amplifikācija	94 %

Audzēja profilēšanas paziņojumu analītiskās validācijas kopsavilkums

Pamatojoties uz noteikšanas robežas, precizitātes, atkārtojamības un pareizības datiem, TSO Comprehensive (EU) tiek analītiski apstiprināta tālāk norādītajam:

- Mazie DNS varianti — SNV, MNV, insercijas un delēcijas.
- TMB
- MSI
- MET un ERBB2 (HER2) gēnu amplifikācijas (skatīt [2. tabula](#)).
- 23 gēni, kuriem var noteikt saplūšanu (skatīt [2. tabula](#)).
- EGFR un MET salaidumu varianti (skatīt [2. tabula](#)).

NTRK klīniskā veikspēja

Lai apstiprinātu TSO Comprehensive (EU) analīzi kā palīgdiagnostiku (CDx) pacientu atlasei ārstēšanai ar VITRAKVI (larotrektinibu), tika testēti paraugi no pacientiem, kas iekļauti larotrektiniba klīniskajos pētījumos (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; kopā saukti par larotrektiniba pētījumu paraugiem), izmantojot datus, kas apkopoti līdz 2019. gada 15. jūlijam, kuri ir papildināti ar komerciāli iegūtiem FFPE audu paraugiem, lai atbalstītu TSO Comprehensive (EU) analīzes Precizitātes pētījumu un Klīnisko paplašināšanas pētījumu.

NCT02122913 bija daudzcentru, atklāta marķējuma, 1. fāzes devas palielināšanas pētījums pieaugušiem pacientiem ar progresējošiem solidiem audzējiem (visiem pacientiem) bez atlases attiecībā uz NTRK pozitīvu vēzi. Pēc pētījuma devas palielināšanas daļas pacientiem ar dokumentētu vēzi ar pozitīvu NTRK saplūšanu un pacientiem, kuri, pēc pētnieka domām, varētu gūt labumu no ļoti selektīva TRK inhibitora, tika uzsākta devas palielināšana. NAVIGATE NCT02576431 ir notiekošs, daudzcentru, atklāta marķējuma, 2. fāzes groza pētījums pacientiem no 12 gadu vecuma ar recidivējošiem progresējošiem solidiem audzējiem ar dokumentētu NTRK saplūšanu, ko novērtējusi ārēja laboratorija. SCOUT NCT02637687 ir notiekošs, daudzcentru, atklāta marķējuma, 1./2. fāzes pētījums pediatrijas pacientiem vecumā no dzimšanas līdz 21 gadam ar progresējošiem solidiem vai primāriem centrālās nervu sistēmas (CNS) audzējiem.

No tiem pacientiem ar pozitīvu NTRK saplūšanu, kas iekļauti TSO Comprehensive (EU) analīzes pētījumā, 164 veidoja larotrektriniba paplašinātās primārās efektivitātes kopu (ePAS4).

Precizitātes pētījums NTRK1, NTRK2, NTRK3 saplūšanas noteikšanai

TSO Comprehensive (EU) analīzes precizitāte NTRK saplūšanas (NTRK1, NTRK2 vai NTRK3) noteikšanai pacientiem ar solīdiem audzējiem tika pierādīta, novērtējot NTRK saplūšanas rezultātu atbilstību starp TSO Comprehensive (EU) analīzi un apstiprinātu ortogonālu NGS bāzes metodi.

Tika veikts retrospektīvs pētījums bez iejaukšanās. Larotrektriniba pētījuma paraugi un papildu paraugi tika testēti ar TSO Comprehensive (EU) analīzi vienā ārējā pētījuma centrā un ar ortogonālu metodi centrālajā laboratorijā. Tika novērtēta TSO Comprehensive (EU) analīzes NTRK saplūšanas noteikšanas precizitāte, salīdzinot ar ortogonālo metodi; tika aprēķināta pozitīvā procentuālā sakritība (PPA), negatīvā procentuālā sakritība (NPA) un saistītie abpusējie 95 % ticamības intervāli (CI).

516 paraugi tika testēti ar TSO Comprehensive (EU) analīzi un/vai ortogonālo metodi. No šiem paraugiem 499 tika testēti ar abām metodēm. Septiņpadsmit no 516 paraugiem netika testēti ar vienu no analīzēm neveiksmīgas ekstrakcijas, nezināma iemesla (ortogonālai metodei) vai novirzes no protokola dēļ. No 499 paraugiem, kas testēti ar abām metodēm, 170 (34,1 %) bija larotrektriniba pētījuma paraugi un 329 (65,9 %) bija papildu paraugi.

Krusttabula ar 499 paraugu rezultātiem ir parādīta [83. tabula](#). No 499 paraugiem 85 paraugiem bija nederīgi TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultāti; no šiem 85 paraugiem 53 paraugiem bija nederīgi arī ortogonālās metodes rezultāti. Vēl septiņiem paraugiem bija nederīgi ortogonālās metodes rezultāti. Tādējādi 407 no 499 paraugiem bija derīgi rezultāti ar abām metodēm.

83. tabula NTRK precizitātes pētījums: Krusttabula ar TSO Comprehensive (EU) rezultātu salīdzinājumu ar ortogonālās metodes rezultātiem, nosakot NTRK saplūšanu

TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultāts	Pozitīva NTRK saplūšana	Ortogonālās metodes rezultāts		
		Negatīva NTRK saplūšana	Nederīgs	Kopā
Pozitīva NTRK saplūšana	114	16	1	131
Negatīva NTRK saplūšana	4	273	6	283
Nederīgi*	4	28	53	85
Kopā	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) analīzes nederīgie rezultāti radušies parauga un izpildes līmenī.

Sakritības analīzes, izslēdzot un ietverot nederīgus TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultātus, ir parādītas [84. tabula](#). Izslēdzot nederīgus TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultātus, PPA bija 96,6 % (114/118; 95 % TI: 91,5 %–99,1 %) un NPA bija 94,5 % (273/289; 95 % TI: 91,2 %–96,8 %).

84. tabula NTRK precizitātes pētījums: TSO Comprehensive (EU) analīzes PPA un NPA salīdzinājumā ar ortogonālās metodes rezultātu, nosakot NTRK saplūšanu

Sakritības mērījums	Izslēdzot nederīgus TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultātus		Ietverot nederīgus TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultātus	
	Sakritība, % (n/N)	95 % TI*	Sakritība, % (n/N)	95 % TI*
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 % TI, pamatojoties uz (precīzu) Klopera-Pīrsona metodi.

Klīniskais paplašināšanas pētījums NTRK1, NTRK2, NTRK3 saplūšanas noteikšanai

Klīniskajā paplašināšanas pētījumā tika pierādīts TSO Comprehensive (EU) analīzes klīniskais derīgums NTRK1, NTRK2 un NTRK3 saplūšanas noteikšanai pacientiem ar solīdiem audzējiem, kuri var gūt labumu no ārstēšanas ar larotrektinību. Pētījums tika veikts, lai novērtētu TSO Comprehensive (EU) analīzes klīnisko efektivitāti, lai identificētu pacientus ar pozitīvu NTRK1, NTRK2 un NTRK3 saplūšanu un tos ārstētu ar larotrektinību, kā arī novērtētu atbilstību starp TSO Comprehensive (EU) analīzes un lokālā testa (LT) metodēm (ko izmanto, lai noteiktu NTRK saplūšanas statusu larotrektinība klīniskajiem pētījumiem).

LT metodes ietvēra NGS, fluorescento in situ hibridizāciju (FISH), polimerāzes ķēdes reakciju (PCR) un NanoString analīzes. NTRK saplūšanas (ETV6 NTRK3) tika konstatētas tiem pacientiem ar iedzimtu fibrosarkomu, kuriem bija dokumentēta ETV6 translokācija, ko noteica ar FISH. Lielākā daļa 235 larotrektinība pētījuma pacientu ar zināmu NTRK saplūšanas statusu tika testēti ar NGS metodēm.

Datu apkopošanas pārtraukšanas datumā, 2019. gada 15. jūlijā, bija iekļauti 279 pacienti. No 279 pacientiem 208 bija pozitīva NTRK saplūšana. No 208 pozitīvajiem pacientiem 164 veidoja larotrektinība ePAS4.

Primārais mērķa kritērijs larotrektinība efektivitātes analīzei bija kopējais atbildes reakcijas rādītājs (ORR) saskaņā ar neatkarīgas pārskatīšanas komitejas (NPK) novērtējumu apkopotā datu kopā no trīs klīniskajiem pētījumiem. ORR tika novērtēts, pamatojoties uz to pacientu īpatsvaru, kuriem ir vislabākā kopējā atbildes reakcija kā apstiprināta pilnīga reakcija vai apstiprināta daļēja reakcija, pamatojoties uz RECIST 1.1. versijas kritērijiem. Larotrektinība ePAS4 ORR bija 72,6 % (95 % TI [65,1 %, 79,2 %]) un ietvēra pacientus ar 16 dažādiem audzēju veidiem.

Paraugu uzskaitē

Paraugu kopa ietvēra plašu audzēju veidu, kā arī pediatriko un pieaugušo pacientu paraugu reprezentāciju.

Līdz 2019. gada 15. jūlijam larotrektinība pētījumos tika iekļauti 279 pacienti. No tiem 235 pacientiem bija zināms NTRK saplūšanas statuss, kā noteikts ar LT metodi: 208 bija pozitīvi un 27 bija negatīvi. 44 pacientiem NTRK saplūšanas statuss nebija zināms, jo testēšana nebija nepieciešama pacienta piemērotībai pētījumam NCT02122913 un SCOUT NCT02637687 devu palielināšanas fāzēs. TSO Comprehensive (EU) analīzes klīniskajam paplašināšanas pētījumam bija piemēroti paraugi no larotrektinība pētījuma pacientiem, kas tika

iekļauti līdz 2019. gada 15. jūlijam ar zināmu NTRK saplūšanas statusu (208 pozitīvi pacienti un 27 negatīvi pacienti), kā arī papildu paraugi, kas ar reprezentatīvām LT metodēm tika noteikti kā negatīvi uz NTRK saplūšanu.

No 208 pozitīvajiem larotrektiniba pētījuma paraugiem 154 bija pieejams paraugs TSO Comprehensive (EU) analīzes testēšanai. No tiem 138 bija derīgi rezultāti. Piecpadsmit paraugi bija nederīgi, jo paraugu sekvencēšanas kvalitātes parametri bija nesekmīgi, un 1 paraugs netika testēts novirzes no protokola dēļ. No 27 negatīvajiem larotrektiniba pētījuma paraugiem 24 bija pieejams paraugs testēšanai. No tiem 22 bija derīgi TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultāti. Divi paraugi bija nederīgi paraugu sekvencēšanas kvalitātes parametru kļūmes dēļ.

Papildu paraugi tika pārbaudīti, izmantojot vienu no divām reprezentatīvām LT metodēm. Tika sagādāti un izmeklēti vairāk nekā 350 paraugi, lai noteiktu audzēja saturu. No papildu paraugiem, kas atbilda parauga prasībām, 266 tika veiksmīgi ekstrahēti un apstiprināti kā negatīvi uz NTRK saplūšanu, izmantojot reprezentatīvu LT metodi. No šiem paraugiem 260 bija pieejami TSO Comprehensive (EU) analīzes testēšanai, no kuriem 222 bija derīgi rezultāti. Starp tiem bija 38 paraugi, kas bija nederīgi paraugu sekvencēšanas parametru kļūmes dēļ (n = 25) vai kuriem neizdevās veikt sekvencēšanu (n = 13). Kopējā kopa ar negatīvu NTRK saplūšanu sastāvēja no 222 papildu paraugiem un 22 larotrektiniba pētījuma paraugiem.

Atbilstības rezultāti

Kopumā ar TSO Comprehensive (EU) tika testēti 437 paraugi. Starp 208 pacientiem ar pozitīvu NTRK saplūšanu bija 153, kuriem bija pieejami paraugi un kuri tika testēti ar TSO Comprehensive (EU), iegūstot 138 derīgus rezultātus un 15 nederīgus rezultātus.

TSO Comprehensive (EU) rezultātu sakritība ar LT metožu rezultātiem ar un bez nederīgiem TSO Comprehensive (EU) rezultātiem ir parādīta [85. tabula](#).

85. tabula NTRK klīniskais laipošanas pētījums: Atbilstība starp TSO Comprehensive (EU) analīzi un LT metodēm NTRK saplūšanas noteikšanai

Sakritības mērījums	Izslēdzot TSO Comprehensive (EU) analīzes nederīgos rezultātus		Ietverot TSO Comprehensive (EU) analīzes nederīgos rezultātus	
	% sakritība (n/N)	95 % TI*	% sakritība (n/N)	95 % TI*
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

* Abpusējie 95 % ticamības intervāli tika aprēķināti, izmantojot (precīzu) Klopera-Pīrsona metodi.

Juīguma analīze pret trūkstošajiem TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultātiem parādīja atbilstības analīzes noturīgumu. Trūkstošie TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultāti pacientiem ar pozitīvu LT NTRK saplūšanu (n = 70) tika aprēķināti, izmantojot logaritmiskās regresijas modeli. Sakritības aprēķini, tostarp aprēķinātās vērtības, ir parādīti [86. tabula](#).

86. tabula NTRK klīniskais laipošanas pētījums: Atbilstība starp TSO Comprehensive (EU) analīzes un LT metodēm NTRK saplūšanas noteikšanai, ieskaitot aprēķinātās vērtības LT pozitīviem pacientiem, kuriem nav TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultātu

Sakritības mērījums	% sakritība	95 % TI*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Trūkstošie TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultāti pacientiem ar negatīvu LT saplūšanu netika aprēķināti.

* Abpusējie 95 % TI tika aprēķināti, pamatojoties uz vairāku trūkstošo vērtību aprēķināšanas Būta metodi. Vairāku trūkstošo vērtību aprēķināšanas Būta metode ir aprēķinu darbība, kas izriet no vairākām trūkstošām vērtībām (Schomaker un Heumann 2018).

Sakritības starp TSO Comprehensive (EU) analīzi un LT pēc metodes veida (piemēram, RNS NGS, FISH) ir parādītas 87. tabula.

87. tabula NTRK klīniskais laipošanas pētījums: Atbilstība starp TSO Comprehensive (EU) analīzi un LT metodēm NTRK saplūšanas noteikšanai pēc LT metodes veida

LT metodes veids	Sakritības mērs	% sakritība (n/N)	95 % TI 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	Nav aprēķināts (1/1)	Nav aprēķināts
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Nav aprēķināts (0/0)	Nav aprēķināts
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Nav aprēķināts: apakšgrupām ar < 5 paraugu skaitu sakritību statistika netika aprēķināta.

¹ Abpusējie 95 % ticamības intervāli tika aprēķināti, izmantojot (precīzu) Klopera-Pirsona metodi.

² Ietver NGS metodes, kas izmanto tikai RNS un gan DNS, gan RNS.

No 437 paraugiem, kas testēti ar TSO Comprehensive (EU) analīzi, 24 bija rezultāti, kas neatbilst LT: 15 bija pozitīvi ar LT un negatīvi ar TSO Comprehensive (EU) analīzi, un 9 bija negatīvi ar LT un pozitīvi ar TSO Comprehensive (EU) analīzi. No 24 paraugiem ar neatbilstīgiem rezultātiem 8 tika testēti ar DNS NGS LT metodi, 14 ar RNS NGS LT metodi un 2 ar FISH.

Apstiprināta neatkarīga NGS metode apstiprināja TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultātus 14 no 24 paraugiem ar neatbilstīgiem rezultātiem. Atlikušajiem 10 paraugiem TSO Comprehensive (EU) analīzes rezultāti bija neatbilstīgi gan ar LT, gan ar neatkarīgo NGS metodi.

Klīniskās efektivitātes rezultāti

ePAS4 kohortā larotrektiniba efektivitāte TSO Comprehensive (EU) pozitīvajā, LT pozitīvajā populācijā (97 pacienti, ORR = 78,4 %, 95 % TI [68,8 %, 86,1 %]) bija līdzīga larotrektiniba efektivitātei kopējā ePAS4 populācijā (164 pacienti, ORR = 72,6 %, 95 % TI [65,1 %, 79,2 %]) (88. tabula). No 97 TSO Comprehensive (EU) pozitīvajiem pacientiem ePAS4 28 (28,9 %) pacienti sasniedza pilnīgu atbildes reakciju/ķirurģisku pilnīgu atbildes reakciju un 48 (49,5 %) pacienti sasniedza daļēju atbildes reakciju.

No 13 TSO Comprehensive (EU) negatīvajiem pacientiem LT pozitīvajā populācijā 1 (7,7 %) uzrādīja pilnīgu atbildes reakciju un 2 (15,4 %) uzrādīja daļēju atbildes reakciju ar larotrektiniba terapiju.

88. tabula NTRK klīniskais laipošanas pētījums: ORR LT pozitīviem pacientiem pēc LT un TSO Comprehensive (EU) rezultātiem ePAS4 kohortā

		LT saplūšana pozitīva N = 164	TSO Comprehensive (EU) Pozitīva un LT pozitīva N = 97	TSO Comprehensive (EU) Negatīva un LT pozitīva N = 13
Labākā kopējā atbildes reakcija, n (%)	Pilnīga reakcija	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Pilnīga ķirurģiska reakcija	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Daļēja atbildes reakcija	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabila slimība	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Progresējoša slimība	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Nav novērtējams	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Kopējais atbildes reakcijas rādītājs	Pacientu skaits, n	164	97	13
	Pacientu skaits ar CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR % (95 % TI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Saīsinājumi: CR = pilnīga reakcija, PR = daļēja reakcija, sCR = ķirurģiska pilnīga reakcija.

* Abpusējais 95 % ticamības intervāls tika aprēķināts, izmantojot (precīzu) Klopera-Pirsona metodi.

54 pacientiem trūkst TSO Comprehensive (EU) analīžu rezultātu.

Šī pētījuma dati atbalsta TSO Comprehensive (EU) analīzes drošumu un efektivitāti, ja to izmanto, lai identificētu pacientus ar solīdiem audzējiem ar NTRK saplūšanu, kuri varētu būt piemēroti ārstēšanai ar larotrektrinibu.

Atsauces

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Piekļūts 2016. gada 3. oktobrī.
2. Eiropas Medicīnas onkoloģijas biedrība. www.esmo.org. Piekļūts 2016. gada 3. oktobrī.

Pārskatījumu vēsture

Redakcija	Datums	Izmaiņu apraksts
Dokuments Nr. 200007789 v08	Maijs 2025	<p>Noņemta atsauce uz programmatūras versijām un daļu numuriem.</p> <p>Atjaunināti procedūras ierobežojumi</p> <ul style="list-style-type: none"> Nekrotisko audu informācija. MSI audzēja satura informācija. <p>Atjaunināti</p> <ul style="list-style-type: none"> NTC zemsvītras piezīme attiecas gan uz mini, gan uz maksi bibliotēkām. Iekārtas un materiāli uzskaita plates centrifūgas specifikācijas un pipetes pieaugumu. SPB papildu daudzuma aprēķins no 1,05x līdz 1,15x. Terminoloģija MET 14. eksona līdz MET 14. eksona izlaišanai. <p>Papildinājumi</p> <ul style="list-style-type: none"> Piezīme par SMB, tverot pirmo un otro mērķi. Sagatavojieties sekvencēšanas ievadīšanai. Papildu ultrasonikatora informācija. <p>Pievienoti precizējumi un atjaunināti veikspējas raksturojuma rezultāti</p> <ul style="list-style-type: none"> Traucējošās vielas. Audzēja profilēšanas un parauga derīguma precizitāte. Noteikšanas robežas 1. un 2. pētījums. Laboratorijas iekšējās precizitātes 1. pētījums. Reproducējamības 2. pētījums. Bibliotēkas stabilitāte un bibliotēkas glabāšanas informācija. Tukšā robeža. <p>Atjaunināti formulējumi un gramatika.</p>

Redakcija	Datums	Izmaiņu apraksts
Dokuments Nr. 200007789 v07	2024. gada janvāris	<ul style="list-style-type: none"> • Pievienota informācija sadaļai Procedūras ierobežojumi <ul style="list-style-type: none"> • Nekrotisku audu un audzēja satura paraugu prasības MSI augstām un somatiskajām veicinošajām mutācijām. • Potenciāli hemoglobīna radīti traucējumi. • Noteikšanas robežas RET gēnā un saplūšanu noteikšana ārpus anotēto gēnu robežām. • Gēnu delēcijas netiek ziņotas. • Atjaunināts izmantošanai ar TSO Comprehensive (ES) Local Run Manager programmatūras versiju 2.3.7. • Pievienota informācija par nepieciešamo, bet komplektā neiekļauto aprīkojumu un materiāliem, tostarp divām papildu ultraskaņas apstrādes ierīces konfigurācijām. • Atjaunināta informācija par paraugiem <ul style="list-style-type: none"> • Nekrotisko audu saturs. • K proteīnāzes un hemoglobīna ietekme. • Uz priekšmetstikliņiem uzliktu FFPE un attīrītu nukleīnskābju uzglabāšana. • Pievienota informācija, lai uzlabotu reaģentu apstrādi, darbplūsmu un problēmu novēršanu izpildes kvalitātes kontroles kļūmēm. • Pievienots konteksts un skaidrojums sadaļā Veiktspējas raksturlielumi <ul style="list-style-type: none"> • Šķērspiesārņojums • Nukleīnskābju ekstrakcijas komplekta novērtējums • Traucējošās vielas • Nukleīnskābju un uz priekšmetstikliņiem novietoto FFPE stabilitāte • NTRK klīniskā veiktspēja • Atjaunināti formulējumi un gramatika
Dokuments Nr. 200007789 v06	2023. gada februāris	<ul style="list-style-type: none"> • Papildu paziņojumi sadaļā Ierobežojumi • Formulējumu atjauninājumi saistībā ar vienošanos, kā arī gramatikas un skaidrības uzlabojumiem • 21., 28., 29., 32., 35., 36., 72. tabulas labojumi • Paziņojums par nosēdumu klātbūtni FSM reaģentā • Atjauninātas amplifikatora un teknes specifikācijas sarakstā lekārtas un materiāli
Dokuments Nr. 200007789 v05	2022. gada septembris	Atjauninātas 2. pētījuma reproducējamības tabulas

Redakcija	Datums	Izmaiņu apraksts
Dokuments Nr. 200007789 v04	2022. gada jūnijs	<ul style="list-style-type: none">• Pievienots TSO Comprehensive analysis module v2.3.5 PN• Noņemts TSO Comprehensive analysis module v2.3.3 PN• Atjaunināta terminoloģija sadaļā Tukšā robeža
Dokuments Nr. 200007789 v03	2022. gada aprīlis	<ul style="list-style-type: none">• Pievienota ar NTRK sapludināšanām saistīta veikspēju raksturojoša informācija• Pievienots marķējums TIKAI EKSPORTAM• Atjaunināts paredzētās lietošanas paziņojums, lai pievienotu NTRK1-3 palīgdiagnostikas apgalvojumu• Paplašināta informācija par produkta komponentiem, lai iekļautu programmatūras komponentu daļu numurus
Dokuments Nr. 200007789 v02	2022. gada februāris	<ul style="list-style-type: none">• Labota tabulas atsauces kļūda• Pievienots ierobežojums, kas saistīts ar dzimumšūnu un somatisko šūnu variantiem• Precizēti formulējumi par gēnu amplifikācijas noteikšanu
Dokuments Nr. 200007789 v01	2021. gada decembris	<ul style="list-style-type: none">• Atjaunināti procedūras ierobežojumi• Precizētas magnētiskā statīva un amplifikatora specifiskācijas aprīkojuma un materiālu sarakstos
Dokuments Nr. 200007789 v00	2021. gada novembris	Sākotnējais laidieni

Patenti un preču zīmes

Īpašumtiesības uz šo dokumentu un tā saturu pieder uzņēmumam Illumina, Inc. un tā saistītajiem uzņēmumiem ("Illumina"), un klients to drīkst izmantot tikai līgumā noteiktajā veidā saistībā ar šajā dokumentā raksturotā produkta(-u) lietošanu, un ne citiem nolūkiem. Šo dokumentu un tā saturu nedrīkst izmantot vai izplatīt nekādiem citiem nolūkiem un/vai citādi publiskot, atklāt vai reproducēt jebkādā veidā bez iepriekšējas rakstiskas Illumina piekrišanas. Ar šo dokumentu Illumina nenodod nekādas licences, ko paredz tā patents, preču zīmes, autortiesības vai anglosakšu tiesības, nedz arī līdzīgas jebkuras trešās personas tiesības.

Šajā dokumentā sniegtie norādījumi ir stingri un precīzi jāievēro kvalificētiem un atbilstoši apmācītiem darbiniekiem, lai nodrošinātu šeit raksturotā(-o) produkta(-u) pareizu un drošu lietošanu. Pirms šā produkta(-u) lietošanas ir pilnībā jāizlasa un jāizprot viss šā dokumenta saturs.

PILNĪBĀ NEIZLASOT UN PRECĪZI NEIEVĒROJOT VISUS ŠAJĀ DOKUMENTĀ IEKĻAUTOS NORĀDĪJUMUS, VAR RASTIES PRODUKTA(-U) BOJĀJUMI, PERSONU MIESAS BOJĀJUMI, TOSTARP LIETOTĀJU UN CITU PERSONU, UN CITA ĪPAŠUMA BOJĀJUMI, TURKLĀT TIKS ANULĒTAS VISAS PRODUKTAM(-IEM) PIEMĒROJAMĀS GARANTIJAS.

ILLUMINA NEUZŅEMAS NEKĀDU ATBILDĪBU, KAS IZRIET NO NEPAREIZAS ŠAJĀ DOKUMENTĀ APRAKSTĪTO PRODUKTU (TOSTARP TĀ DAĻU VAI PROGRAMMATŪRAS) LIETOŠANAS.

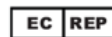
© 2025 Illumina, Inc. Visas tiesības aizsargātas.

Visas preču zīmes ir Illumina, Inc. vai to attiecīgo ģiņnieku ģiņšums. Detalizētu preču zīmju informāciju skatiet vietnē www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformācija



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122, ASV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ārpus Ziemeļamerikas)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Produktu marķēšana

Pilnīgu atsauci uz simboliem, kas parādās uz produkta iepakojuma un marķējuma, savam komplektam skatiet simbolu atslēgā vietnes support.illumina.com cilnē *Documentation* (Dokumentācija).