

„TruSight Oncology Comprehensive illumina® (EU)“

Pakuotės lapelis

NAUDOTI IN VITRO DIAGNOSTIKAI. TIK EKSPORTUI.

Numatytoji paskirtis

„TruSight™ Oncology Comprehensive (EU)“ yra *in vitro* diagnostinis testas, kuris naudoja tikslingą naujos kartos sekoskaitą 517 genų variantams aptikti, naudojant nukleino rūgštis, išskirtas iš formalinu fiksuotų, į parafiną įdėtus (FFPE) vėžiu sergančių pacientų, sergančių solidiniais piktybiniais navikais, naviko audinio mėginius, naudojant „illumina® NextSeq™ 550Dx instrument“ . Testą galima naudoti norint aptikti vieno nukleotido variantus, kelių nukleotidų variantus, intarpus, iškritas ir genų amplifikacijas iš DNR ir genų suliejimo bei splaisingo variantus iš RNR. Testas taip pat informuoja apie naviko mutacinės naštos (TMB) įvertį ir mikrosatelitų nestabilumo (MSI) būseną.

Testas atliekamas kaip gretutinė diagnostika, skirta vėžiu sergantiems pacientams identifikuoti gydymui taikant [Lentelė 1](#) nurodytą tikslingą terapiją pagal patvirtintą terapinio preparato ženklinimą. Be to, testas skirtas suteikti navikų profiliavimo informaciją, skirtą naudoti kvalifikuotiems sveikatos priežiūros specialistams pagal profesines gaires, ir nėra išsamus arba privalomas, kad būtų galima žymėti bet kokią konkretų terapinį preparatą.

Lentelė 1 „Companion Diagnostics“ indikacija

Naviko tipas	Biologiniai žymenys	Tikslinė terapija
Solidiniai navikai	NTRK1, NTRK2 ir NTRK3 Genų suliejimas	„VITRAKVI®“ (larotrektnibas)

Tyrimo santrauka ir paaiškinimas

Klinikinis aprašas

Vėžys yra pagrindinė mirties priežastis visame pasaulyje ir jis gali atsirasti bet kokiame audinyje.^{1, 2} Naviko genetinio pagrindo analizė yra svarbi nustatant pacientus, kuriems gali būti naudingas tikslinis gydymas, ir kuriant naujus gydymo būdus. Daugybė genų yra susiję su vėžio atsiradimu ar progresavimu, o daugelyje vėžinių susirgimų yra įvairių variantų, turinčių įtakos šiems genams ir jų funkcijoms. Šie variantai gali būti tokios genų mutacijos kaip vieno nukleotido variantai (SNV), kelių nukleotidų variantai (MNV), intarpus arba iškritas, genų amplifikacija, genų suliejimas ir splaisingo variantai. Kita vėžio genų mutacijų pasekmė – neoantigenai, sukeliantys vėžiui būdingą imuninį atsaką. Vėžio mutacijos būklę gali atspindėti TMB ir MSI – genominiai požymiai, susiję su vėžio neoantigenų pristatymu.

„TruSight Oncology Comprehensive“ yra kokybinis naujos kartos sekoskaitos (NGS) išsamaus genomo profiliavimo (CGP) testas, kuriuo plačiai vertinami didelės grupės su vėžiu susijusių genų, išvardytų [Lentelė 2](#), genomo variantai. Tyrimo metu 517-oje genų aptinkami variantai, taip pat genų amplifikacijos, suliejimo ir splaisingo variantai, kaip nurodyta [Lentelė 2](#). Analizė apima visų genų, išskyrus TERT, kodavimo seką, kurioje yra tik promoterių sritis, ir įvertina TMB įvertį bei MSI būseną. Šie tyrimo tikslai apima profesinių organizacijų ir kitų svarbiausių JAV institucijų cituojamą turinį. Nepriklausomų konsorcių publikacijos ir vėlyvieji farmacijos moksliniai tyrimai taip pat turėjo įtakos tyrimo „TSO Comprehensive“ kūrimui.

Regionų, kuriems netaikomas variantų priskyrimas, sąrašą rasite „TruSight Oncology Comprehensive“ blokų sąrašas (dokumentas Nr. 200009524), kurį galima rasti Illumina pagalbos svetainėje. Blokų sąrašas kai kuriuose failuose vadinamas juoduoju sąrašu.

[Lentelė 2](#) nurodytos keturios variantų kategorijos: Mažas DNR variantas (S), genų amplifikacija (A), suliejimas (F) ir splaisingo variantas (Sp). Maži DNR variantai apima SNV, MNV ir intarpus bei iškritas.

Lentelė 2 „TSO Comprehensive (EU)“ Tyrimo genų grupė

Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas
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

Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
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

Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTB	S	230	3190	HNRNP	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
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

Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCs1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
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

Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
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

Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas	Nr.	„Entrez“ ID	Genas	Varianto tipas
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma	Netaikoma

Procedūros principai

Ištyrimas „TSO Comprehensive (EU)“ yra paskirstytas testas, atliekamas rankiniu būdu, naudojant išskirtą nukleino rūgštį kaip įvesties medžiagą. DNR ir (arba) RNR, išskirta iš formalinu fiksuoto parafinu įtvirtinto audinio (FFPE), naudojama bibliotekoms paruošti, kurios vėliau praturtinamos su vėžiu-susijusiais genais ir sekvenuojamos „NextSeq 550Dx instrument“.

Ištyrimas „TSO Comprehensive (EU)“ apima toliau aprašytus procesus.

- **Bibliotekos paruošimas ir sodrinimas** — RNR atveju iš viso 40 ng konvertuojama į dvigrandę komplementarią DNR (kDNR). Genominės DNR (gDNR) reikmėms 40 ng gDNR yra sukarpomama į mažus fragmentus. Universalūs sekvenavimo adapteriai liguojami ant kDNR ir gDNR fragmentų. Į kiekvieną biblioteką įtraukiamos P5 ir P7 adapterių sekos, kad sekvenavimo metu būtų galima užfiksuoti bibliotekos fragmentus ant pratekamosios kiuvetės paviršiaus. Adapteriuose yra i5 ir i7 indekso sekos, pagal kurias galima identifikuoti kiekvieną atskirą mėginį, o gDNA mėginių bibliotekų atveju – atskiras molekules, naudojant unikalius molekulinius identifikatorius (UMI). Tada bibliotekos sodrinamos konkrečių dominančių genų reikmėms, taikant fiksavimu pagrįstą metodą. Biotinilintų zondų sekos, aprėpiančios dominančias genų sritis, į kurias nukreiptas tyrimas, yra hibridizuotos bibliotekoms. Zondai ir hibridizuotos tikslinės bibliotekos yra izoliuojamos nuo netikslių bibliotekų, užfiksuojant streptavidino magnetinėmis dalelėmis. Tikslinės prisodrintos bibliotekos yra plaunamos ir amplifikuojamos. Kiekvienos prisodrintos bibliotekos kiekis normalizuojamas naudojant granulių metodą, kad būtų užtikrintas vienodas atstovavimas sekvenavimui skirtingose sujungtose bibliotekose.
- **Sekvenavimas ir pradinė analizė** — Normalizuotos prisodrintos bibliotekos yra sujungiamos ir sugrupuojamos ant pratekamosios kiuvetės, o po to sekvenuojamos sintezės sekvenavimo (SBS) chemijos būdu, naudojant „NextSeq 550Dx“. SBS chemijai taikomas ciklinio grįžtamojo terminatoriaus metodas siekiant aptikti pavienes fluorescenciškai pažymėtas pavienių deoksiribonukleotidų trifosfato (dNTP) bazes, kurios yra įtrauktos į augančias DNR grandines. Kiekvieno sekvenavimo ciklo metu į nukleorūgšties grandinę pridėjama viena dNTP. dNTP žymuo naudojama kaip polimerizacijos terminatorius. Po kiekvieno dNTP įtraukimo vizualizuojami fluorescenciniai dažai, kad būtų galima nustatyti bazę, o tada suskaityti, kad būtų galima įtraukti kitą nukleotidą. Keturi grįžtamieji prie terminatoriaus prijungti dNTP (A, G, T ir C) yra kaip atskiros molekulės. Dėl to natūrali konkurencija sumažina įtraukimo paklaidą. Atliekant pirminę analizę, bazių identifikavimai atliekami tiesiogiai pagal signalo intensyvumo matavimus kiekvieno sekvenavimo ciklo metu, todėl sekvenuojama-bazėmis-. Kiekvienam bazės identifikavimui priskiriamas kokybės įvertis.
- **Antrinė analizė** — „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis yra „NextSeq 550Dx Instrument“ kaip „Local Run Manager“ programinės įrangos dalis, skirta palengvinti „TSO Comprehensive (EU)“ serijos paruošimą ir atlikti antrinę sekvenavimo rezultatų analizę. Antrinė analizė apima serijos apdorojimo ir kokybės kontrolės patvirtinimą, po to demultipleksavimą, FASTQ failų sukūrimą, sugretinimą ir varianto identifikavimą. Demultipleksavimas atskiria duomenis iš sujungtų bibliotekų pagal unikalius sekos indeksus, kurie buvo pridėti bibliotekos paruošimo procedūros metu. Sukuriami FASTQ tarpiniai failai, kuriuose yra kiekvieno mėginio sekvenavimo nuskaitymai ir kokybės įverčiai, išskyrus nuskaitymus iš bet kurių klasterių, kurie neperėjo filtro. Sekvenavimo nuskaitymai sugretinami su

referentiniu genomu, kad būtų galima nustatyti sekų sąryšį, ir jiems priskiriamas įvertis pagal panašumo sritis. Sugretinti nuskaitymai įrašomi į failus BAM formatu. Analizės programinė įranga naudoja atskirus algoritmus bibliotekoms, sukurtoms iš DNR ir (arba) RNR mėginių, kad identifikuotų mažus DNR variantus, genų amplifikacijas, TMB ir MSI DNR mėginiams, ir RNR mėginių suliejimus ir splaisingo variantus. Analizės programinės įrangos modulis sukuria keletą išvesčių, įskaitant sekvenavimo metriką ir Variantų priskyrimo formatus (VCF) failus. VCF failuose pateikiama informacija apie variantus, aptiktus konkrečiose referentinio genomo padėtyse. Kiekvienam mėginiui sukuriami sekvenavimo metrika ir atskiri išvesties failai. Daugiau informacijos apie antrinę ir tretinę analizę rasite „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module“ darbo eigos žinyne (dokumento Nr. 200008661).

- **Tretinė analizė**—Tretinė analizė, kurią atlieka „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis, susideda iš TMB ir MSI skaičiavimų, gretutinės diagnostikos identifikavimo, navikų profiliavimo į du klinikinės reikšmės lygius, naudojant Žinių bazę (KB) ir audinio tipą, ir rezultatų ataskaitos sukūrimą. Naviko profiliavimas taip pat gali būti vadinamas išsamiu genominiu profiliavimu. Interpretuoti varianto rezultatai, taip pat TMB ir MSI biologinių žymenų rezultatai apibendrinami „TSO Comprehensive (EU)“ rezultatų ataskaitoje.

Procedūros apribojimai

Naudoti tik *in vitro* diagnostikai.

- Naudoti tik paskyrus gydytoji. Tyrimas turi būti atliekamas laikantis klinikinių laboratorinių reikalavimų.
- Genominiai duomenys, išvardyti numatytosios paskirties [Lentelė 2](#), nėra rekomenduojami arba galutiniai bet kokio konkretaus terapinį produkto vartojimo pagal jo etiketę atžvilgiu.
- Variantų, išvardytų „TSO Comprehensive (EU)“ rezultatų ataskaitos „Genominiai rezultatai su klinikinės reikšmės įrodymais“ (2 lygis) ir „Genominiai rezultatai, galintys turėti klinikinės reikšmės (3 lygis), klinikinis patvirtinimas nebuvo atliktas.
- Sprendimai dėl pacientų priežiūros ir gydymo turi būti priimami remiantis gydančiojo gydytojo nepriklausomu medicininio vertinimu, atsižvelgiant į visą atitinkamą informaciją apie paciento būklę, pvz., paciento ir šeimos istoriją, medicininės apžiūros, kitų diagnostinių tyrimų informaciją ir paciento pageidavimus, laikantis standartinės sveikatos priežiūros tvarkoje konkrečioje bendruomenėje.
- FFPE mėginio kokybė būna labai įvairi. Iš mėginių, kuriems nebuvo atliktos standartinės fiksavimo procedūros, gali nepavykti išskirti nukleorūgščių, atitinkančių serijos KK reikalavimus ([Kokybės kontrolė 80 psl.](#)). FFPE blokų, kurie buvo laikomi ilgiau nei penkerius metus, validumas būna mažesnis.
- Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ veiksmingumas su mėginiais, paimtais iš pacientų, kuriems buvo atlikta organų arba audinių transplantacija, nebuvo įvertintas.
- Didelis nekrozinio audinio kiekis ($\geq 25\%$) gali trukdyti „TSO Comprehensive (EU)“ ištyrimui, siekiant aptikti genų amplifikacijas ir RNR suliejimus.
- Somatinės skatinamosios mutacijos gali nebūti patikimai aptiktos, jei naviko kiekis (pagal plotą) yra mažesnis nei 20 %.
- „MSI-High“ (MSI-H) būseną gali nebūti patikimai aptikta, jei naviko kiekis yra mažesnis nei 30 %.

- Hemoglobinas, susijęs su audiniais, sumažina MET splaisingo variantų patvirtinamųjų nuskaitymų skaičių.
- Labai pertvarkytose genomose su iškritomis ir heterozigotiškumo netekimu „TSO Comprehensive (EU)“ programinė įranga gali klaidingai klasifikuoti DNR mėginį kaip užterštą (CONTAMINATION_SCORE > 3106 ir p vertė > 0,049).
- Neigiamas rezultatas neatmeta, kad mutacija yra žemiau ištyrimo aptikimo ribų (LoD).
- Jautrumą mažų DNR variantų aptikimui gali paveikti:
 - Mažo sudėtingumo genominis kontekstas.
 - Variantų ilgio didinimas.
- TMB įverčiai gali būti netikslūs šiomis aplinkybėmis:
 - Kai naviko kiekis pasiekia lygį, kuriame konverguojasi gonocitų linijos ir somatinių variantų alelių dažniai (VAF).
 - Kai populiacija nėra pakankamai atstovaujama viešose duomenų bazėse.
- Genų amplifikacijos yra vieninteliai kopijų skaičiaus variantai, apie kuriuos praneša „TSO Comprehensive (EU)“. Apie genų iškritas tyrime nepranešama.
- Suliejimo identifikavimo algoritmai, naudojami „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo programinėje įrangoje, gali neatsižvelgti į duomenis, gautus iš nuskaitymų, kurie išeina už anototų genų ribų.
- Suliejimų aptikimo jautrumas gali būti paveiktas:
 - Dėl mažo bibliotekos sudėtingumo sumažėjus patvirtinamųjų nuskaitymų dėl ištyrimo darbo eigos nukrypimų (pvz., atlikite maišymo veiksmus, nurodytus skyriuje [RNR denatūravimas ir aneliavimas 44 psl.](#)).
 - Kai vienas genas apima abu lūžio taškus.
 - Tais atvejais, kai kelių suliejimų lūžio taškai yra arti vienas kito su vienu arba keliais partneriais; keli lūžio taškai ir partneriai gali būti pateikiami kaip vienas lūžio taškas ir partneris.
 - Pagal mažus vidutinius iterpimo dydžius. Reikalaujama, kad mažiausias medianinis įterpimo dydis būtų 80 bp, tačiau jautrumas mažėja 80–100 bp intervale.
 - Dėl mažo sekos sudėtingumo arba homologinio genomo konteksto aplink suliejimų lūžio taškus.
- Genų, dalyvaujančių suliejime, skiriamoji geba gali būti paveikta, kai suliejimai lūžio taškai atsiranda genominėse srityse, kuriose yra persidengiančių genų. Jeigu keli genai sutampa su lūžio tašku, ištyrimas praneš apie visus genus, atskirdamas juos kabliataškiais.
- Dėl mažo gylio nenuosekli aprėptis TERT promoterių srityje gali lemti nulinį rezultatą „No Result“ (Nėra rezultato).
- Anotacijos arba KB klaidos gali sukelti klaidingai teigiamą arba klaidingai neigiamą rezultatą, įskaitant varianto priskyrimą netinkamam lygiui (tarp „Genominių rezultatų, turinčių klinikinės reikšmės įrodymų“ (2 lygis), ir „Genominių rezultatų, galinčių turėti klinikinės reikšmės“ (3 lygis), arba ataskaitoje pateikta anotacijos informacija gali būti klaidinga. Klaidos galimybė yra iš šių trijų šaltinių:
 - „TSO Comprehensive (EU)“ varianto anotacija. Remiantis 2 448 350 variantų iš „COSMIC v92“ analize, klaidų lygis yra maždaug 0,0027 %, todėl klaidų tikimybė yra nedidelė.

- KB klaida dėl duomenų analizės ir interpretavimo arba pakopų nustatymo proceso.
- KB turinio aktualumas laikui bėgant keičiasi. Ataskaita atitiks žinias tuo metu, kai buvo analizuojama ir interpretuojama KB versija.
- „TSO Comprehensive (EU)“ yra skirtas pranešti apie somatinius variantus, kai pateikiami variantai, turintys klinikinės reikšmės požymių, arba variantai, galintys turėti klinikinę reikšmę. Kadangi testas skirtas tik navikams, nėra numatyta, bet gali būti pranešta apie gonocitų linijos (paveldėtus) variantus. „TSO Comprehensive (EU)“ naudoja KB, kad praneštų apie variantus, aiškiai nenurodydama, ar jie yra gonocitų linijos ar somatinės kilmės.
- KB apima tik terapines, diagnostines ir prognostines asociacijas, kurios yra svarbios variantui, esančiam nustatytoje solidinio piktybinio naviko neoplazmoje. Jautrumo arba vėžio rizikos asociacijos neįtrauktos į KB.
- Tolesnėje lentelėje rodomi trijų RET variantų nukleotidų pokyčiai, kurių tyrimas negali aptikti. Gali būti aptikti kiti to paties aminorūgščių pokyčio nukleotidų pokyčiai.

Lentelė 3 Nukleotido pokyčiai trims RET variantams

Amino rūgščių pokytis	Chromosoma	Padėtis	Atskaitos alelis	Alternatyva
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 = chromosoma

Produkto komponentai

„TSO Comprehensive (EU)“ testą sudaro tokie komponentai:

- „TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ rinkinys (Illumina katalogo Nr. 20063092) – Rinkinyje yra reagentai, kurių turis yra pakankamas 24 DNR ir 24 RNR bibliotekoms generuoti. Tai apima pacientų mėginius ir kontrolines medžiagas. Kontrolė įsigyjama atskirai (žr. [Reikalingi reagentai \(nepateikti\) 18 psl.](#)).
- Žinių bazė: Reguliariai atnaujinama ir ją galima atsisiųsti į Illumina „Lighthouse“ portalą.
- „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis (Illumina katalogo Nr. 20051843*), kuriame yra šie komponentai ir palaikomas naviko profiliavimas bei NTRK:
 - Pareiškimų paketai „TSO Comprehensive (EU)“ v2.3.0 versija (PN 20109338)
 - „TSO Comprehensive (EU)“ v2.3.7 versija, programinės įrangos paketas (PN 20116450)
 - „TSO Comprehensive (EU)“ v2.3.7 + pareiškimų paketai „TSO Comprehensive (EU)“ v2.3.0 USB rinkinys (PN 20116451)
- „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis (Illumina katalogo Nr. 20051843*), kuriame yra šie komponentai ir palaikomas naviko profiliavimas bei NTRK:
 - Pareiškimų paketai „TSO Comprehensive (EU)“ v2.0.0 versija (PN 20051760)
 - „TSO Comprehensive (EU)“ v2.3.5 versija, programinės įrangos paketas (PN 20075244)
 - „TSO Comprehensive (EU)“ 2.3.5 versija, USB rinkinys (PN 20075239)

* „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis. Illumina techninės priežiūros atstovas įdiegia atitinkamą „TSO Comprehensive (EU)“ analizės modulis versiją į „Local Run Manager“ „NextSeq 550Dx instrument“. Darbo eigos žinyno ir analizės modulio programinės įrangos versiją žr. [Lentelė 4](#).

Lentelė 4 „TSO Comprehensive“ analizės modulio programinės įrangos versijos darbo eigos žinynas

Darbo eigos žinynas	Audinys	TSO Comprehensive programinės įrangos versija
200008661	FFPE	v2.3.5 arba v2.3.7

Reagentai

Pateikti reagentai

Su „TSO Comprehensive (EU)“ rinkiniu pateikiami toliau nurodyti reagentai.

„TruSight Oncology Comp RNA Library Prep“, PN 20031127

Reagentas	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	Veikliosios medžiagos	Laikymo temperatūra
„First Strand Synthesis Mix“ (FSM)	20031431	1	260 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų ir nukleotidų	Nuo -25 iki -15 °C
„Second Strand Mix“ (SSM)	20031432	1	720 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų, DNR polimerazės, ribonukleazės H ir nukleotidų	Nuo -25 iki -15 °C
„Elution Primer Frag Mix“ (EPH3)	20031433	1	250 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų ir atsitiktinių heksamerų.	Nuo -25 iki -15 °C
„Reverse Transcriptase“ (RVT)	20031434	1	70 µl	Buferinis vandeninis tirpalas su Reverse Transcriptase	Nuo -25 iki -15 °C

„TruSight Oncology Comp Library Prep“ (užšaldytas), PN 20031118

Reagentas	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	Veikliosios medžiagos	Laikymo temperatūra
„End Repair A-tailing A“ (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra T4 DNR polimerazės ir polinukleotidų kinazės	Nuo -25 iki -15 °C
„End Repair A-tailing B“ (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų ir nukleotidų	Nuo -25 iki -15 °C
„Adapter Ligation Buffer 1“ (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų	Nuo -25 iki -15 °C

Reagentas	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	Veikliosios medžiagos	Laikymo temperatūra
„DNA Ligase 3“ (LIG3)	20031438	2	190 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra ligazės	Nuo -25 iki -15 °C
„Short Universal Adapters 1“ (SUA1)	20031439	1	290 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra universalių sekvenavimo oligonukleotidų	Nuo -25 iki -15 °C
„UMI Adapters v1“ (UMI)	20031496	1	290 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra universalių sekvenavimo oligonukleotidų	Nuo -25 iki -15 °C
„Stop Ligation Buffer“ (STL)	20031440	2	480 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų	Nuo -25 iki -15 °C
„Enhanced PCR Mix“ (EPM)	20031441	2	550 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra DNR polimerazės ir nukleotidų	Nuo -25 iki -15 °C

„TruSight Oncology Comp Library Prep“ (laikyti šaldytuve), PN 20031119

Reagentas	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	Veikliosios medžiagos	Laikymo temperatūra
„Resuspension Buffer“ (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų	2–8 °C
„Sample Purification Beads“ (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandeninis tirpalas, kuriame yra magnetinių granulių	2–8 °C
„TE Buffer“ (TEB)	20013443	1	10 ml	„Tris EDTA“ tirpalas	2–8 °C

„TruSight Oncology Comp UP Index Primers“, PN 20031120

Veikliosios medžiagos: Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra individualiai brūkšninio kodu koduotų oligonukleotidų pradmenų.

**DĖMESIO!**

RNR arba DNR mėginiams naudokite unikalius indekso pradmenis (UPxx). Vienoje bibliotekoje neįjunkite CPxx ir UPxx indekso pradmenų.

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

„TruSight Oncology Comp CP Index Primers“, PN 20031126

Veikliosios medžiagos: Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra individualiai brūkšninio kodu koduotų oligonukleotidų pradmenų.

**DĖMESIO!**

„Combinatorial Index Primers“ (CPxx) naudokite tik DNR mėginiams. Vienoje bibliotekoje neįjunkite CPxx ir UPxx indekso pradmenų.

Indekso pradmenys	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	i7 indeksas	Seka	i5 indeksas	Seka	Laikymo temperatūra
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	Nuo -25 iki -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	Nuo -25 iki -15 °C

Indekso pradmenys	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	i7 indeksas	Seka	i5 indeksas	Seka	Laikymo temperatūra
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	Nuo -25 iki -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCGCGC	D520	GTCCGAGG	Nuo -25 iki -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	Nuo -25 iki -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	Nuo -25 iki -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCGCGC	D507	ACGTCCTG	Nuo -25 iki -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	Nuo -25 iki -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	Nuo -25 iki -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCGCGC	D508	GTCAGTAC	Nuo -25 iki -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	Nuo -25 iki -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	Nuo -25 iki -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCGCGC	D519	CCGTCGCC	Nuo -25 iki -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	Nuo -25 iki -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	Nuo -25 iki -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	Nuo -25 iki -15 °C

„TruSight Oncology Comp Enrichment“ (laikyti šaldytuve), PN 20031123

Reagentas	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	Veikliosios medžiagos	Laikymo temperatūra
„Target Capture Buffer 1“ (TCB1)	20031477	2	870 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra formamido ir druskų	2–8 °C
„Streptavidin Mag Beads“ (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Buferinis vandeninis tirpalas su druskomis ir kietosios fazės paramagnetinėmis granulėmis, kovalentiškai padengtomis streptavidinu	2–8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natrio hidroksido tirpalas	2–8 °C
„Elute Target Buffer 2“ (ET2)	20031480	2	290 µl	Buferinis vandeninis tirpalas	2–8 °C
„Library Normalization Beads 1“ (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Buferinis vandeninis tirpalas su kietosios fazės paramagnetinėmis granulėmis.	2–8 °C
„Library Normalization Wash 1“ (LNBW1)	20031482	2	4,8 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra 2-merkaptoetanolio ir formamido	2–8 °C

Reagentas	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	Veikliosios medžiagos	Laikymo temperatūra
„Library Normalization Storage Buffer 1“ (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų	2–8 °C
„Resuspension Buffer (RSB)“	20031444	1	12,4 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų	2–8 °C
„Sample Purification Beads“ (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vandeninis tirpalas, kuriame yra magnetinių granulių	2–8 °C

„TruSight Oncology Comp Enrichment“ (užšaldytas), PN 20031121

Reagentas	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	Veikliosios medžiagos	Laikymo temperatūra
„Target Capture Additives 1“ (TCA1)	20031486	2	521 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra oligonukleotidų	Nuo -25 iki -15 °C
„Enhanced Enrichment Wash“ (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra druskų	Nuo -25 iki -15 °C
„Enrichment Elution 2“ (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra ploviklio	Nuo -25 iki -15 °C
„Enhanced PCR Mix“ (EPM)	20031441	2	550 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra DNR polimerazės ir nukleotidų	Nuo -25 iki -15 °C
„PCR Primer Cocktail 3“ (PPC3)	20031490	2	150 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra P5 ir P7 pradmenų	Nuo -25 iki -15 °C
„Library Normalization Additives 1“ (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra 2-merkaptoetanolio ir formamido	Nuo -25 iki -15 °C
„PhiX Internal Control“ (PX3 arba PhiX)	20031492	1	10 µl	Buferinis vandeninis tirpalas, kuriame yra PhiX genominė DNR	Nuo -25 iki -15 °C

„TruSight Oncology Comp Content Set“, PN 20031122

Reagentas	Katalogo numeris	Kiekis	Tūris	Veikliosios medžiagos	Laikymo temperatūra
„Oncology RNA Probe Pool“ (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotidų zondų junginys	Nuo -25 iki -15 °C
„Oncology DNA Probe Pool 2“ (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotidų zondų junginys	Nuo -25 iki -15 °C

Reikalingi reagentai (nepateikti)

Preamplifikacijos reagentai

- DNR ir RNR išskyrimo ir gryninimo reagentai – reagento reikalavimus rasite skyriuje [Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl.](#)
- DNR ir RNR kiekybinio įvertinimo reagentai – reagento reikalavimus rasite skyriuje [Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl.](#)
- „TruSight Oncology“ Kontrolės:
 - „TruSight Oncology“ DNR kontrolė (Illumina katalogo Nr. 20065041)
 - „TruSight Oncology“ RNR kontrolė (Illumina katalogo Nr. 20065042)
- Etanolis (EtOH) 100 % (200 stiprumo), molekulinės biologijos reikmėms.
- „RNase/DNase-free water“.

Poamplifikacijos reagentai

- „NextSeq 550Dx“ Didelio našumo reagentų rinkinys v2.5 (300 ciklų) (Illumina katalogo Nr. 20028871)
 - „NextSeq 550Dx“ „High Output Flow Cell Cartridge“ v2.5 (300 ciklų)
 - „NextSeq 550Dx“ „High Output Reagent Cartridge“ v2 (300 ciklų)
 - „NextSeq 550Dx“ „Buffer Cartridge“ v2 (300 ciklų)
- Etanolis 100 % (200 stiprumo), molekulinės biologijos reikmėms
- „RNase/DNase-free water“

Reagentų laikymas ir tvarkymas

Šių reagentų dėžės siunčiamos užšaldytos. Laikyti nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.

Dėžė	Katalogo numeris	Laboratorijos sritis
„TruSight Oncology Comp RNA Library Prep“	20031127	Preamplifikacija

Dėžė	Katalogo numeris	Laboratorijos sritis
„TruSight Oncology Comp Library Prep“ (užšaldytas)	20031118	Preamplifikacija
„TruSight Oncology Comp UP Index Primers“	20031120	Preamplifikacija
„TruSight Oncology Comp CP Index Primers“	20031126	Preamplifikacija
„TruSight Oncology Comp Enrichment“ (užšaldytas)	20031121	Poamplifikacija
„TruSight Oncology Comp Content Set“	20031122	Poamplifikacija



DĖMESIO!

Reagentų nelaikykite bešerkšnėje saugykloje arba šaldytuvo durelių skyriuose.

Toliau nurodytos reagentų dėžutės yra siunčiamos ant gelio pakuočių, kad būtų išlaikyta nuo 0 °C iki 10 °C temperatūra. Laikyti 2–8 °C temperatūroje.

Dėžė	Katalogo numeris	Laboratorijos sritis
„TruSight Oncology Comp Library Prep“ (laikyti šaldytuve)	20031119	Preamplifikacija
„TruSight Oncology Comp Enrichment“ (laikyti šaldytuve)	20031123	Poamplifikacija



DĖMESIO!

Neužšaldykite reagentų, kurių sudėtyje yra granulių (LNB1, SPB ir SMB).

- Reagentų išoriniai pokyčiai gali reikšti, kad medžiagos yra sugadintos. Jeigu atsiranda išorinių pokyčių (pvz., reagentų spalvos pokyčių arba drumzlių), reagentų nenaudokite.
- FSM, SSM, ERA1-B ir TCB1 gali turėti su produktu susijusių dalelių. Vadovaukitės kiekvieno reagento specialiomis naudojimo gairėmis. Atlikus FSM ir SSM maišymo veiksmus, likusios su gaminiu susijusios baltos dalelės nepaveiks veiksmingumo.
- Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ stabilumas buvo įvertintas ir veiksmingumas įrodytas rinkinį naudojant iki keturių kartų. Reagentai išlieka stabilūs, jeigu jie laikomi nurodytoje temperatūroje, iki nurodytos galiojimo pabaigos datos, nurodytos dėžutės etiketėje.

Įranga ir medžiagos

Reikalinga įranga ir medžiagos – neprisidėta

Preamplifikacijos įranga ir medžiagos

Įranga	Tiekėjas
Ultragarso aparatas su susijusiais priedais Žr. Ultragarso garsiakalbio konfigūracijos nustatymai DNR suskaidymui 24 psl.	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Toliau nurodytų specifikacijų termocikleris. - Šildomas dangtis, kurį galima nustatyti 30 °C ir 100 °C temperatūrai (arba išjungti, jeigu jis negali palaikyti 30 °C) - Apima 4–99 °C temperatūros intervalą ±0,25 °C temperatūros tikslumas - Suderinama su 96 šulinėlių PCR plokštelėmis, 0,2 ml - Žr. Termociklerio kitimo sparta 25 psl.	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Sūkurinis maišytuvas	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Mikromėginio inkubatoriai (2) su įdėklų 96 šulinėlių MIDI plokštelėms (2)	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Mikrocentrifuga	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Centrifuguokite (plokštelių centrifuga) naudodami šias galimybes: 96 šulinėlių mikroplokštelių centrifugavimas 280 × g	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Plokštelių purtytuvas su šiomis galimybėmis: 2 mm orbita - Gali purtyti 1 200 aps./min. ir 1 800 aps./min. greičiu	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Sandarinimo pleištas arba volelis	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Magnetinis stovas su šiomis specifikacijomis: - Skirtas paramagnetinių granulių kritulių precipitacijai / atskyrimui - Magnetai stovo šone – ne apačioje 96 šulinėlių MIDI plokštelėms	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas

Įranga	Tiekėjas
Tiksliosios pipetės galinčios tiksliai tiekti nuo 2 µl iki 1000 µl tūrio su šiomis specifikacijomis: • Vieno arba kelių kanalų pipetė su 0,02 ml padidėjimu • Vieno arba kelių kanalų pipetė su 0,1 ml, 0,2 ml arba 0,5 ml padidėjimu • Vieno arba kelių kanalų pipetė su 1 µl arba 2 µl padidėjimu Pipetės turi būti reguliariai kalibruojamos ir tikslios 5 % nuo nurodyto tūrio.	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Automatinė pipetė	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Ledo arba šalčio blokas	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
10 ml serologinės pipetės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Klijų sandarikliai 96 šulinėlių plokštelėms su šiomis specifikacijomis: • Nulupami • Tinka PCR plokštelėms su krašteliu arba pusiniu krašteliu • Stiprūs klijai, atlaikantys kelis temperatūros pokyčius nuo -20°C iki 100°C • Be DNazės / RNazės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
1,7 ml talpos mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai, be nukleazės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Reagentų rezervuarai be nukleazės (vienkartinis lovelis, 50 ml) (arba lygiavertis)	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
15 ml kūginiai mėgintuvėliai	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
50 ml kūginiai mėgintuvėliai	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Suderinami aerosoliui atsparūs pipečių antgaliai	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
96 šulinėlių laikymo plokštelės, 0,8 ml (MIDI plokštelės)	„Fisher Scientific“, dalies Nr. AB-0859 arba lygiavertis
96 šulinėlių PCR plokštelės, 0,2 ml (polipropileno)	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas

Poamplifikacijos įranga ir medžiagos

Įranga	Tiekėjas
„NextSeq 550Dx“ Instrument	illumina, katalogo Nr. 20005715
Centrifuguokite (plokštelių centrifuga) naudodami šias galimybes: • 96 šulinėlių mikroplokštelių centrifugavimas • 280 × g	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Toliau nurodytų specifikacijų termocikleris. • Šildomas dangtis (100 °C) • Apima 4–99 °C temperatūros intervalą • ±0,25 °C temperatūros tikslumas • Suderinama su 96 šulinėlių PCR plokštelėmis, 0,2 ml • Žr. Termociklerio kitimo sparta 25 psl.	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Sūkurinis maišytuvas	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Mikromėginio inkubatorius su įdėklų 96 šulinėlių MIDI plokštelėms	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Sauso kaitinimo blokas su šiomis specifikacijomis: • 25–99 °C temperatūros intervalas • ±5 °C temperatūros tikslumas • Įsitikinkite, kad mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai yra suderinami su kaitinimo bloku	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Plokštelių purtytuvas su šiomis galimybėmis: • 2 mm orbita • Gali purtyti 1 200 aps./min. ir 1 800 aps./min. greičiu	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Mikrocentrifuga	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Sandarinimo pleištas arba volelis	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Magnetinis stovas su šiomis specifikacijomis: • Skirtas paramagnetinių granulių kritulių precipitacijai / atskyrimui • Magnetai stovo šone – ne apačioje • 96 šulinėlių MIDI plokštelėms	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas

Įranga	Tiekėjas
Tiksliosios pipetės, turinčios šias specifikacijas: - Vieno arba kelių kanalų pipetė su 0,02 ml padidėjimu - Vieno arba kelių kanalų pipetė su 0,1 ml, 0,2 ml arba 0,5 ml padidėjimu - Vieno arba kelių kanalų pipetė su 1 µl arba 2 µl padidėjimu Pipetės turi būti reguliariai kalibruojamos ir tikslios 5 % nuo nurodyto tūrio.	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Automatinė pipetė	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
10 ml serologinės pipetės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Klijų sandarikliai 96 šulinėlių plokštelėms su šiomis specifikacijomis: - Nulupami - Tinka PCR plokštelėms su krašteliu arba pusiniu krašteliu - Stiprūs klijai, atlaikantys kelis temperatūros pokyčius nuo -20°C iki 100°C - Be DNazės / RNazės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
2 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai, be nukleazės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Mikrocentrifugavimo mėgintuvėliai, be nukleazės	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Reagentų rezervuarai be nukleazės (vienkartinis lovelis, 50 ml) (arba lygiavertis)	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
15 ml kūginiai mėgintuvėliai	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
50 ml kūginiai mėgintuvėliai	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Suderinami aerosoliui atsparūs pipečių antgaliai	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
96 šulinėlių laikymo plokštelės, 0,8 ml (MIDI plokštelės)	„Fisher Scientific“, dalies Nr. AB-0859 arba lygiavertis
96 šulinėlių PCR plokštelės, suderinamos su termocikleriu, 0,2 ml (polipropileno šulinėliai)	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas
Ledo arba šalčio blokas	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas

Ultragarso garsiakalbio konfigūracijos nustatymai DNR suskaidymui

DNR fragmentacija arba karpymas veikia tyrimo veiksmingumą, nustatant fragmento dydžio pasiskirstymą, kuris savo ruožtu turi poveikį sekos aprėpčiai. Buvo įvertintos ir optimizuotos kelios fokusuoto poveikio ultragarsu konfigūracijos „TSO Comprehensive (EU)“ ([Lentelė 5](#)).

- Buvo pakoreguotas kirpimo laikas, kad būtų maksimaliai padidinta MEDIAN_EXON_COVERAGE metrika, nurodyta skyriuje [Kokybės kontrolė 80 psl.](#) Karpymo trukmė (žr. [Lentelė 5](#)) skirtingose konfigūracijose skyrėsi taip pat, kaip ir MEDIAN_INSERT_SIZE rezultatai.
- 1–4 konfigūracijos buvo išbandytos su 8 juostų stiklo mėgintuvėliais, o 5 konfigūracijai buvo naudojamas vienas stiklinis vamzdelis. Mėgintuvėlio tūrio pajėgumai parodyti [Lentelė 5](#).
- 3, 4 ir 5 (mažesni vandens vonelės tūriai) konfigūracijų optimizavimui buvo naudojamas pulsavimas ir buvo karpoma mažesnio tūrio mėgintuvėliuose. Mėgintuvėlių tūrio pajėgumai turi įtakos kirpimo parametrams.
- 4 konfigūracijai (linijos keitikliui, vidutinio dydžio vandens vonelės tūriui, degazuotam vandeniui) reikėjo ilgo impulso delsos laiko (40 sekundžių), kad būtų pasiektas panašus MEDIAN_EXON_COVERAGE, kaip 1 ir 2 konfigūracija, esant nominaliai 40 ng įvesčiai.
- Optimalios 3 konfigūracijos nuostatos lėmė šiek tiek didesnį fragmento dydžio pasiskirstymą, palyginti su kitomis konfigūracijomis (MEDIAN_INSERT_SIZE buvo maždaug 5–10 bazinių porų didesnis).
- 3 ir 5 konfigūracijose naudojamas nedegazuotas vanduo ir mažiausi vandens vonelių dydžiai, todėl reikėjo padidinti DNR įvestį (50 ng 3 konfigūracijai, 60 ng 5 konfigūracijai), kad būtų pasiektas panašus MEDIAN_EXON_COVERAGE, palyginti su kitomis 3 konfigūracijomis, kurios naudojo nominalią 40 ng įvestį.
- 3 ir 5 konfigūracijos turi daugiau žalos ir (arba) denatūracijos, todėl sumažėja veiksminga galimų panaudoti dsDNR molekulių masė bibliotekoms paruošti.

Centrifuguokite karpymo mėgintuvėlius paėmimo proceso metu, kad įsitikintumėte, jog paimtas nurodytas tūris, nes bet koks medžiagos praradimas gali neigiamai paveikti veikimo charakteristikas.

Lentelė 5 Įvertintos fokusuoto ultragarso aparato konfigūracijos

Parametras	Konfigūracija				
	1	2	3	4	5
Keitiklis	Linija	Taškas	Taškas	Linija	Taškas
Vandens vonelės tūris	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml
Degazuotas vanduo	Taip	Taip	Ne	Taip	Ne
Vandens aušintuvas	Taip	Taip	Taip	Taip	Taip
Vandens vonelės temperatūra	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20°C
Didžiausia krintančios bangos galia (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W
% darbo režimo koeficientas	30	10	30	25	20
Ciklai per seriją	200	200	1000	1000	1000
Pulsavimas (10 sekundžių trukmės intervalai)	Ne	Ne	Taip	Taip	Taip
Pulsavimo atidėjimo laikas	Netaikoma	Netaikoma	10 s	40 s	10 s
Karpymo trukmė	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹
Mėginio apdorojimas	1–8	1	1	1–8	1
Partijos dydis	1–96	1–96	1–8	1–8	1
Stiklinio 8 juostų mėgintuvėlio mėginio dydis	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Vienas mėgintuvėlis (50 µl)
DNR įvesties ekvivalentas (egzonų aprėpties mediana)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng

¹ 200 sekundžių karpymo trukmę sudaro 10 sekundžių trukmės serijos, kartojamos 20 kartų.

² 320 sekundžių karpymo trukmę sudaro 10 sekundžių trukmės serijos, kartojamos 32 kartus.

Termociklerio kitimo sparta

Termociklerio kitimo sparta turi įtakos tyrimo kokybės kontrolės metrikai (naudojamoms MSI vietoms, Median Bin Count CNV Target, medianiniam įterpimo dydžiui (RNR)) ir patvirtinamiesiems nuskaitymams, susijusiems su splaisingo variantais ir suliejimais. Rekomenduojama optimizuoti termociklerio kitimo spartą. Pavyzdžiui, išbandytas modelis buvo pakoreguotas nuo numatytosios (ir didžiausios) 5–3 laipsnių °C/s kitimo spartos, kad būtų gauti rezultatai, panašūs į kitų modelių, kurių numatytoji kitimo sparta yra mažesnė.

Mėginių surinkimas, transportavimas ir laikymas

Rinkdami, transportuodami, laikydami ir apdorodami mėginius laikykitės standartinės procedūros.

Mėginiui taikomi reikalavimai

FFPE audinys

Ištyrimui „TSO Comprehensive (EU)“ reikia 40 ng RNR ir (arba) 40 ng DNR, išgautos iš FFPE audinio. Naudojant RNR ir DNR galima analizuoti visus nurodytus variantų tipus. Audinį reikia fiksuoti naudojant formalino fiksatyvą, tinkamą molekulinei analizei (pvz., 10 % neutralaus buferizuoto formalino). Audinys neturi būti dekalcifikuotas. Prieš atliekant ištyrimą „TSO Comprehensive (EU)“, audinių mėginį turi ištirti patologas, kad įsitikintumėte, jog jis tinkamas šiam tyrimui. Norint aptikti somatinės skatinamąsias mutacijas, reikia mažiausiai 20 % naviko (pagal plotą). Norint patikimai aptikti MSI būseną įvairiuose mėginiuose, reikia mažiausiai 30 % naviko kiekio. Jei mėginys tiriamas su mažiau nei 30 % naviko kiekiu, kad būtų galima nustatyti rezultatus su kitais variantų tipais, MSS rezultatas gali būti nepatikimas. MSI-H rezultatas yra teisingas nepriklausomai nuo naviko kiekio.

Genų amplifikacijų ir RNR variantų kiekis navike priklauso nuo amplifikacijos ar sintezės raiškos apimties (žr. skyrelį [Naviko kiekis 99 psl.](#)).

Esant didelei tikimybei išgauti 40 ng RNR ir 40 ng DNR iš įvairių kietųjų audinių tipų, rekomenduojamas audinio tūris yra $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Šis tūris atitinka bendrą gyvybingo audinio plotą $\geq 200 \text{ mm}^2$ naudojant 5 μm storio pjūvius arba $\geq 100 \text{ mm}^2$ naudojant 10 μm storio pjūvius. Bendras audinio plotas yra gyvybingo audinio ploto visuose išskyrimui patektuose segmentuose suma. Pavyzdžiui, 200 mm^2 bendrą audinio plotą galima gauti išgaunant keturis 5 μm sluoksnius 50 mm^2 audinio ploto arba penkis 10 μm sluoksnius 20 mm^2 audinio ploto. Audinių nekrozė gali sumažinti gautų nukleorūgščių kiekį. Siekiant sumažinti klaidingai neigiamų rezultatų tikimybę, audinys gali būti makrodisekuojamas, kad būtų pasiektas pageidaujamas gyvybingas naviko kiekis.

Didelis nekrozinio audinio kiekis ($\geq 25\%$) gali trukdyti „TSO Comprehensive (EU)“ ištyrimui, siekiant aptikti genų amplifikacijas ir RNR suliejimus. Jei mėginio pjūviuose yra daugiau kaip 25% nekrozės nuo bendro audinio ploto, nekrozinis audinys turi būti makroskopiškai išpjautas. Jei laboratorijoje kartu su tyrimu atliekama RNR analizė, imant audinius iš audinių bloko reikia vengti hemoglobino arba jo kiekį sumažinti iki minimumo. Žr.

[Trukdančiosios medžiagos 92 psl.](#)

Skaidrėje esantį FFPE audinį kambario temperatūroje galima laikyti iki 28 dienų.

Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas

- RNR ir DNR išskirkite iš FFPE audinių mėginių, naudodami rinkoje esančius išskyrimo rinkinius. Išskyrimo rinkinių skirtumai gali turėti poveikį veikimo charakteristikoms. Žr. [Nukleorūgšties išskyrimo rinkinio įvertinimas 90 psl.](#)

- Nedidinkite proteinazės K ar lygiaverčio fermento ekstrahuojant iš standartinės koncentracijos, pateiktos išskyrimo rinkinyje. Žr. [Trukdančiosios medžiagos 92 psl.](#)
- Išskirtą nukleorūgšties kiekį laikykite laikydamiesi išskyrimo rinkinio gamintojo nurodymų.
- Išgautą DNR laikykite iki 28 dienų nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje.
- Išgautą RNR laikykite iki 28 dienų nuo -85 °C iki -65 °C temperatūroje.
- Norėdami išvengti koncentracijos pokyčių laikui bėgant, išmatuokite DNR ir RNR 28 dienų laikotarpyje prieš pradėdami ruošti biblioteką. Kiekybiškai įvertinkite RNR ir DNR taikydami fluorometrinį kiekybinio įvertinimo metodą, kuriame naudojami nukleorūgštį surišantys dažai. Nukleorūgšties koncentracija turi būti bent trijų matavimų vidurkis.
- Atliekant tyrimą reikia 40 ng kiekvieno RNR mėginio, paruošto „RNase/DNase-free water“ (nepateikta), kurio galutinis tūris yra 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Tyrimui reikia 40 ng kiekvieno gDNA mėginio, kurio mažiausia ekstrakcijos koncentracija yra 3,33 ng/µl. Karpymui reikalingas galutinis 52 µl (0,77 ng/µl) tūris, mažiausiai 40 µl TEB (pateikiama), naudojamas kaip skiediklis.

Bibliotekos saugykla

Bibliotekas 7–30 dienų laikykite mažos jungiamosios gebos PCR plokštelėse, priklausomai nuo bibliotekos tipo (žr. [Lentelė 6](#)).

Lentelė 6 Bibliotekos laikymo trukmė

Bibliotekos tipas	Plokštelė	Dienų skaičius	Laikymo temperatūra
cDNR	PCF PCR	≤7	Nuo -25 iki -15 °C
Fragmentuota gDNR	LP PCR	≤7	Nuo -25 iki -15 °C
Išankstinis sodrinimas	ALS PCR	≤30	Nuo -25 iki -15 °C
Po sodrinimo	ELU2 PCR	≤7	Nuo -25 iki -15 °C
PCR po sodrinimo	PL PCR	≤30	Nuo -25 iki -15 °C
Normalizuota	NL PCR	≤30	Nuo -25 iki -15 °C

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Sauga



PERSPĖJIMAS

Šiame reagentų rinkinyje yra galimai pavojingų cheminių medžiagų. Pavojus žmogui kyla, jei pavojingos medžiagos įkvepiamos, nuryjamos, patenka ant odos ir į akis. Dirbant su pavojingomis medžiagomis, esančiomis reagentuose, vėdinimas turi būti tinkamas. Dėvėkite tinkamai nuo pavojaus saugančias apsaugines priemones, įskaitant akių apsaugos priemones, pirštines ir laboratorinį chalātą. Su panaudotais reagentais elkitės kaip su cheminėmis atliekomis ir utilizuokite laikydamiesi taikomų regiono, nacionalinių ir vietinių įstatymų bei teisės aktų. Papildomos aplinkosaugos, sveikatos ir saugos informacijos ieškokite saugos duomenų lape adresu support.illumina.com/sds.html.

1. Visus mėginius tvarkykite taip, tarsi jie būtų žinai užkrečiamieji.
2. Laikykites įprastų laboratorinių atsargumo priemonių. Nesiurbkite pipetės burna. Darbo vietoje nevalgykite, negerkite ir nerūkykite. Dirbdami su mėginiais ir tyrimo reagentais, mūvėkite vienkartinės pirštines ir dėvėkite laboratorinius chalatus. Baigę dirbti su mėginiais ir tyrimo reagentais kruopščiai nusiplaukite rankas.

Laboratorija

1. Norėdami išvengti užteršimo, išdėstykite laboratoriją vienakrypte darbo eiga. Preamplifikacijos ir poamplifikacijos srityse turi būti speciali įranga ir medžiagos (pvz., pipetės, pipečių antgaliai, maišytuvai ir centrifuga). Kad išvengtumėte amplifikacijos produkto arba zondo pernašos, perėję į poamplifikacijos sritį, negrįžkite į preamplifikacijos sritį.
2. Norėdami išvengti amplifikacijos preparato pernašos, indekso PCR ir sodrinimo veiksmus atlikite poamplifikacijos srityje.
3. Bibliotekos paruošimo procedūroms reikalinga aplinka be ribonukleazų / deoksiribonukleazų.- Kruopščiai nukenksminkite darbo vietas naudodami ribonukleazes / deoksiribonukleazes slopinantį valiklį.- Naudokite plastikus, sertifikuotus kaip neturinčius ribonukleazės, deoksiribonukleazės ir žmogaus genomo DNR.
4. Atlikdami procedūras po valymo, prieš kiekvieną procedūrą ir po jos kruopščiai nuvalykite darbo paviršius ir įrangą šviežiai pagamintu 0,5 % natrio hipochlorito (NaOCl) tirpalu. Leiskite tirpalui 10 minučių paveikti paviršius, o tada kruopščiai nuvalykite 70 % etilo arba izopropilo alkoholiu.
5. Naudokite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlius, lėkšteles, pipečių antgalius ir rezervuarus be nukleazės.
6. Viso ištyrimo metu naudokite kalibruotą įrangą. Būtinai kalibruokite įrangą pagal šiame protokole nurodytą greitį, temperatūrą ir tūrį.

7. Naudokite tikslias pipetes, kad užtikrintumėte tikslų reagento ir mėginio pateikimą. Reguliariai kalibruokite pagal gamintojo specifikacijas.
8. Naudodami daugiakanales pipetes, vadovaukitės šiomis gairėmis:
 - Pipetuokite mažiausiai $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Įsitikinkite, kad barjeriniai antgaliai gerai laikosi ir tinka daugiakanalės pipetės prekių ženklui ir modeliui.
 - Pritvirtinkite antgalius sukamuoju judesiu, kad užtikrintumėte, jog visi antgaliai vienodai gerai pritvirtinti.
 - Įsiurbkite 90° kampu, vienodu skysčio kiekiu visuose antgaliuose.
 - Sumaišykite visus komponentus pipetuodami reakcijos mišinį aukštyn ir žemyn.
 - Išpylę įsitikinkite, kad skystis išpiltas iš kiekvieno antgalio.
9. Būtinai naudokite tyrimui nurodytą įrangą ir nustatykite programas taip, kaip nurodyta.
10. Nurodytos termociklerio ir mikromėginio inkubatoriaus temperatūros nurodo reakcijos temperatūrą, nebūtinai nustatytą įrangos temperatūrą.

Ištyrimas

1. Vengti kryžminės taršos
 - Dirbdami su mėginiais ir reagentais, laikykitės tinkamų laboratorinių metodų.
 - Naudokite naujas eksploatacines laboratorijos medžiagas ir naujus pipetės antgalius kiekvienam mėginiui ir dozuojamam reagentui.
 - Naudokite aerozolio poveikiui atsparius antgalius, kad sumažintumėte kryžminės taršos riziką.
 - Naudokite vienkryptę darbo eigą, kai pereinate iš preamplifikacijos į poamplifikacijos sritis.
 - Vienu metu tvarkykite ir atidarykite tik vieną indeksinį pradmenį. Kiekvieną indeksinį mėgintuvėlį iškart po naudojimo vėl uždenkite. Komplekte yra papildomų dangtelių.
 - Dažnai keiskite pirštines, jeigu jos liečiasi su indekso pradmenimis arba mėginiais.
 - Pašalinkite iš darbo vietos nepanaudotus indekso pradmenų mėgintuvėlius.
 - Negrąžinkite reagentų į mėgintuvėlius po jų panaudojimo juostiniame mėgintuvėlyje, lovelyje arba rezervuare.
 - Maišykite mėginius pipete ir centrifuguokite plokštelę, kai nurodyta.
 - Naudokite mikroplokštelių purtytuvą. Nesukiokite plokštelių.
2. Nenaudokite tyrimo komponentų iš skirtingų tyrimo rinkinių partijų. Reagentų rinkinio partijos nurodytos reagentų rinkinio dėžutės etiketėje ir pagrindinės partijos lape.
3. Kad nukleazės ir PCR preparatai neužterštų reagentų, prietaisų, mėginių ir bibliotekų, būtina laikytis tinkamos laboratorinės praktikos. Užteršimas nukleaze ir PCR produktu gali lemti netikslius ir nepatikimus rezultatus.
4. Kad, ištyrimas būtų veiksmingas ir tinkamai laikoma, reikalingas tinkamas plokštelės tipas. Būtinai laikykitės plokštelės perkėlimo nurodymų, pateiktų skyriuje [Naudojimo instrukcija 39 psl.](#)

5. Nesilaikant nurodytų procedūrų gali būti gauti klaidingi rezultatai arba smarkiai suprastėti bibliotekos kokybė.
6. Jeigu [Naudojimo instrukcija 39 psl.](#), nenurodyta saugaus sustojimo vieta, nedelsdami pereikite prie kito veiksmo.
7. Tyrimo reagentus arba komponentus laikykite nustatytoje temperatūroje nurodytose -preamplifikacijos ir -poamplifikacijos srityse.
8. Reagentų nelaikykite bešerkšnėje saugykloje arba šaldytuvo durelių skyriuose.
9. Neužšaldykite reagentų, kurių sudėtyje yra granulių (LNB1, SPB ir SMB).
10. Nenaudokite reagentų, kurie buvo laikomi netinkamai.
11. Nenukrypkite nuo kiekvienam reagentui nurodytų maišymo ir tvarkymo procedūrų. Netinkamai sumaišius arba per stipriai sumaišius reagentus, mėginių rezultatai gali būti negauti.
12. FSM, SSM, ERA1-B ir TCB1 gali turėti su produktu susijusių dalelių. Vadovaukitės kiekvieno konkretaus reagento naudojimo gairėmis. Atlikus FSM ir SSM maišymo veiksmus, likusios su gaminiu susijusios baltos dalelės nepaveiks veiksmingumo.
13. Paruoškite naujus pagrindinius mišinius ir po naudojimo išmeskite likusį jų kiekį.
14. Plovimo etapams visada paruoškite šviežio 80 % etanolio su „RNase/DNase-free water“. Etanolis gali absorbuoti vandenį iš oro, o tai gali turėti įtakos rezultatams. Panaudotą 80 % etanolį išmeskite laikydamiesi vietos, regiono ir (arba) šalies taisyklių.
15. Perkelkite nurodytą eliuato kiekį. Perkeliant mažiau nei nurodytą eliuato kiekį eliuavimo etapu, gali būti pakenkta rezultatams.
16. Ultragarso aparatams naudokite toliau pateiktas rekomendacijas. Būtinai laikykitės gamintojo nurodymų.
 - gDNR į ultragarsinį mėgintuvėlį pilkite lėtai, kad nesudarytumėte burbuliukų. Pernelyg dideli burbuliukai arba oro tarpas karpymo mėgintuvėlyje gali lemti nevisišką fragmentavimą.
 - Į ultragarsinius mėgintuvėlius lašinkite lėtai ir venkite purslų.
 - Kad išvengtumėte skysčio sutrikdymo ir mėginio praradimo, traukdami fragmentuotą DNR pipetės antgalio nekiškite į ultragarsinio mėgintuvėlio apačią.
17. Pipete nelašinkite mažiau kaip 2 µl mėginio kiekio.
18. Nenaudokite reagentų išdavimo lovelio veiksmams, kuriems į kiekvieną mėginio šulinėlį reikia įdėti mažiau nei 10 µl medžiagos.
19. Naudodami mažo antgalio pipetę perneškite fragmentuotą gDNR mėginį iš ultragarsinių mėgintuvėlių į Bibliotekos paruošimo (LP) plokštelę.
20. Negalima derinti SUA1 ir UMI adapterių kartu.
21. Su RNR mėginiais naudokite SUA1 adapterius.
22. UMI adapterius naudokite su DNR mėginiais.
23. Kiekvienam bibliotekos mėginiui priskirkite skirtingus indekso pradmenis, kad būtų galima unikalčiai identifikuoti kiekvieną biblioteką, kai ji sujungiama sekvenuoti vienoje pratekamojoje kiuvetėje.
24. Toje pačioje bibliotekoje nederinkite CPxx ir UPxx indekso pradmenų.

25. Nesutapusi mėginių ir indeksavimo pradmenimis gaunamas klaidingas rezultatas dėl teigiamo mėginio identifikavimo praradimo. Įveskite mėginių ID ir priskirkite indeksus „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis prieš pradėdami bibliotekų ruošimą. Ruošdami biblioteką įrašykite mėginio ID, indeksavimą ir plokštelės šulinėlio orientaciją.
26. Iš RNR mėginių gautoms bibliotekoms naudokite tik UPxx indeksus.
27. Iš DNR mėginių gautoms bibliotekoms naudokite tik UPxx arba CPxx indeksus.
28. Sekvenuokite daugiausiai 8 RNR bibliotekas ir 8 DNR bibliotekas vienoje pratekamojoje kiuvetėje. Sekvenuokite mažiausiai 3 bibliotekas. Vadovaukitės gairėmis, pateiktomis skyriuje [Bibliotekų skaičius ir indeksų pasirinkimas 36 psl.](#)
29. Po surišimo veiksmo skyriuje [Pirmas taikinių fiksavimas 60 psl.](#) ir [Antras taikinių fiksavimas 64 psl.](#), nedelsdami pereikite prie plovimo veiksmo, kad granulės neišdžiūtų.
30. Plovimo metu nuo šulinėlių dugno pašalinkite visą 80 % etanolį. Likęs etanolis gali paveikti rezultatus.
31. Kad ištyrimas veiktų optimaliai, laikykitės [Naudojimo instrukcija 39 psl.](#) nurodyto plovimų skaičiaus.
32. Atlikdami [Bibliotekų normalizavimas 70 psl.](#) procedūras (1 psl.), kruopščiai iš naujo suspenduokite bibliotekos granulių sandaras, kad pratekamojoje kiuvetėje būtų pasiektas pastovus telkinio tankis.
33. Nedelsdami praneškite apie bet kokius rimtus su šiuo gaminiu susijusius incidentus Illumina ir valstybių narių, kuriose yra įsikūręs naudotojas ir pacientas, kompetentingoms institucijoms.

Procedūros pastabos

- Darbo „TSO Comprehensive (EU)“ eigą galima atlikti pagal toliau pateiktą tvarkaraštį:
 - 1 diena: kDNR sintezė iš RNR mėginių, DNR fragmentavimas į gDNR mėginius, bibliotekos paruošimas ir pradedama hibridizacija per naktį (pirmoji).
 - 2 diena: Bibliotekų sodrinimas, prisodrintų bibliotekų normalizavimas ir įkėlimas į „NextSeq 550Dx instrument“.Jeigu pagal šį tvarkaraštį neįmanoma atlikti „TSO Comprehensive (EU)“ darbo eigos, protokole nurodytos kelios saugios sustojimo vietos. Jei protokole nenurodytas saugaus sustojimo taškas, nedelsdami pereikite prie kito veiksmo.
- Bibliotekas, gautas iš RNR ir DNR mėginių, galima paruošti vienu metu atskiruose šulinėliuose.
- Pagrindinio mišinio paruošimo lentelėse nurodytas tūrio perviršis, skirtas užtikrinti, jog apdorojamų mėginių skaičiui pakanka tūrio.
- Naudokite molekulinės klasės vandenį, kuriame nėra nukleazų.
- Pripylę reagento, antgalį praskalaukite vieną kartą įsiurbdami ir išpildami į atitinkamą plokštelės šulinėlį, jeigu kitaip nenurodyta procedūroje.
- Kambario temperatūra yra nuo 15 °C iki 30 °C.
- Reagentus, mėginius ir / arba bibliotekas reikia laikyti šaltai, atliekant tam tikrus naudojimo instrukcijų veiksmus. Tai apibrėžiama kaip laikymas ant ledo arba jo ekvivalento.

Termociklerių programos

- Prieš pradėdami protokolą, užprogramuokite termociklerio programas, skirtas preamplifikacijos ir poamplifikacijos įrangai.
- Įsitinkite, kad PCR plokštelės gerai priglunda prie termociklerio.
- Naudokite termociklerio gamintojo rekomenduojamas plokšteles.

Plokštelės uždarymas ir atidarymas

- Visada užsandarinkite plokšteles nauju lipniu sandarikliu. Sandariklių nenaudokite pakartotinai.
- Norėdami užsandarinti plokštelę, tvirtai užklijuokite lipnią dangą ant plokštelės sandarinimo pleištu arba voleliu.
- Prieš atlikdami toliau nurodytus protokolo veiksmus, guminiu voleliu visada užsandarinkite 96 šulinėlių plokštelę nauja lipniu sandarikliu, kad padengtumėte plokštelę:
 - Plokštelės purtymo veiksmas
 - Centrifugavimo veiksmas

- Apdorojimo termocikleryje veiksmas
- Hibridizacijos
- Ilgalaikis laikymas
- Įsitikinkite, kad kraštai ir šulinėliai yra užsandarinti, kad sumažėtų kryžminio užteršimo ir išgaravimo rizika.
- Plokštelę padėkite ant lygaus paviršiaus ir lėtai nuimkite plėvelę.
- Jeigu ant plokštelės šulinėlių sandariklio arba šoninių sienelių pastebimas koks nors skystis arba kondensatas, prieš atplėsdami 1 minutę centrifuguokite $280 \times g$.
- Naudokite lipnius plokštelės sandariklius, kurie yra veiksmingi nuo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ iki $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir tinka PCR plokštelėms su krašteliu arba pusiniu krašteliu.

Įranga

- Prieš pradėdami tyrimą pasirūpinkite, kad laboratorijos darbuotojai būtų susipažinę su gamintojo nurodymais dėl visos įrangos naudojimo ir priežiūros.

Plokštelės tipas ir plokštelių perkėlimai

- Kad, ištyrimas būtų veiksmingas ir tinkamai laikoma, reikalingas tinkamas plokštelės tipas.
- Perkeldami medžiagą tarp plokštelių, perkelkite nurodytą tūrį iš kiekvienos plokštelės šulinėlio į atitinkamą paskirties plokštelės šulinėlį.
- Perkelti mėginius tarp mėgintuvėlių eilių arba plokštelių galima naudoti daugiakanales pipetes.
- Pūtydami plokšteles, laikykitės toliau pateiktų nurodymų.
 - Plokštelėms pūtyti naudokite plokštelių pūtytuvą. Nesukiokite plokštelių.
 - PCR plokšteles pūtykite 1 200 aps./min. greičiu.
 - MIDI plokšteles pūtykite 1 800 aps./min. greičiu.
 - Vadovaukitės gamintojo nurodymais, kad įsitikintumėte, jog plokštelės pūtytuvas patikimai laiko plokštelę.

Centrifugavimas

- Kai protokolo nurodymai nurodoma centrifuguoti trumpai, centrifuguokite $280 \times g$ 1 minutę.
- Jeigu ant sandariklio arba šulinėlio šonuose pastebimas skystis, 1 minutę centrifuguokite plokštelę $280 \times g$.

Reagentų naudojimas

- Tvirtai uždarykite visus reagentų mėgintuvėlius iš karto po naudojimo, kad sumažintumėte garavimą ir išvengtumėte užteršimo.
- Kai nebereikia procedūrai, grąžinkite reagentus į nurodytos temperatūros saugyklą.

- Atlikite reagentų paruošimu, nurodytą prieš kiekvieną [Naudojimo instrukcija 39 psl.](#) skyrių.
- Būtinai paruoškite reikiamą pagrindinio mišinio, eliuavimo mišinio ir 80 % etanolio kiekį.
- Į pagrindinio mišinio ir tirpalo lentelėse nurodytą tūrį įtrauktas perviršis. Perviršio kiekis apskaičiuojamas taip:
 - [Lentelė 15](#)
 - $FSM \text{ tūris} = (7,2 \mu\text{l}) \times (\text{mėginių skaičius} + \text{kontrolinės medžiagos}) \times (1,25).$
 - $RVT \text{ tūris} = (0,8 \mu\text{l}) \times (\text{mėginių skaičius} + \text{kontrolinės medžiagos}) \times (1,25).$
 - [Lentelė 22](#)
 - $ERA1-B \text{ tūris} = (7,2 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (1,20).$
 - $ERA1-A \text{ tūris} = (2,8 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (1,20).$
 - [Lentelė 30](#)
 - $EE2 \text{ tūris} = (20,9 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (1,364).$
 - $HP3 \text{ tūris} = (1,1 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (1,364).$
 - [Lentelė 31](#)
 - $EE2 \text{ tūris} = (20,9 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (1,364).$
 - $HP3 \text{ tūris} = (1,1 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (1,364).$
 - [Lentelė 37](#)
 - $LNA1 \text{ tūris} = (38,1 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (2,0).$
 - $LNB1 \text{ tūris} = (6,9 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (2,0).$
 - [Lentelė 38](#)
 - $EE2 \text{ tūris} = (30,4 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (1,25).$
 - $HP3 \text{ tūris} = (1,6 \mu\text{l}) \times (\text{bibliotekų skaičius}) \times (1,25).$

Adapterių rinkiniai

- „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimas apima SUA1 ir UMI adapterius.
- SUA1 adapteriai skirti naudoti su RNR mėginiais. Neskirta naudoti su DNR mėginiais.
- UMI adapteriai skirti naudoti su DNR mėginiais. Neskirta naudoti su RNR mėginiais.

Granulių naudojimas

- Ištyrime „TSO Comprehensive (EU)“ naudojamos trijų tipų granulės (SPB, SMB ir LNB1). Procedūros metu įsitikinkite, kad naudojamas tinkamas granulių tipas.
- Atlikite tinkamą kiekvieno granulių tipo plovimų skaičių.
- Prieš naudodami įsitikinkite, kad granulės yra kambario temperatūroje.

- Prieš naudodami 1 minutę sumaišykite granules, kad užtikrintumėte homogeniškumą.
- Maišydami granules pipete, vadovaukitės šiomis rekomendacijomis:
 - Naudokite maišomam tūriui tinkamą pipetę ir antgalio dydį.
 - Nustatykite tūrio nuostatą maždaug ties 50–75 % mėginio tūrio.
 - Lėtai pipetuokite neatleisdami stūmoklio.
 - Venkite sudaryti purslus ir burbuliukus.
 - Laikykite pipetės antgalį virš granulių ir lašinkite tiesiai į granulę, kad granulės būtų atlaisvintos iš šulinėlio arba mėgintuvėlio.
 - Įsitikinkite, kad visa granulių sanakaupa yra tirpale. Tirpalas turėtų atrodyti tamsiai rudas ir būti vienalytės konsistencijos.
 - Įvertinkite, ar yra granulių sanakaupa. Atsargiai įsiurbkite viso granulių tirpalą iš šulinėlio į antgalį ir pažvelkite į šulinėlių apačią.
- Jeigu granulės įsiurbiamos į pipetės antgalius atliekant magnetinio atskyrimo veiksmus, išpilkite granules atgal į plokštelės ant magnetinio stovo šulinėlį. Prieš pereinami prie kito procedūros etapo, palaukite, kol skystis taps skaidrus (maždaug 2 minutes).
- Plaudami granules:
 - Plokštei naudokite rekomenduojamą magnetinį stovą.
 - Išpilkite skystį tiesiai ant granulių sanaukų, kad šulinėlių šone esančios granulės būtų sudrėkintos.
 - Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo, kol pagal procedūrą bus nurodyta ją išimti.
 - Nejudinkite plokštelės, kol ji yra ant magnetinio stovo.
 - Kol yra ant magnetinio stovo, nepažeiskite granulių sanaukų.
- Plaudami granules arba pašalindami supernatantą, šulinėlių apačioje pakreipkite pipetės antgalius kampu, kad nesukurtumėte vakuumo ir neįtrauktumėte tirpalo į pipetės antgalio filtrus.

Bibliotekų skaičius ir indeksų pasirinkimas

Prieš paruošdami seriją, suplanuokite mėginių bibliotekų ir mėginių indeksų skaičių sekvenavimo seriją. Toliau pateiktose mėginių skaičiaus gairėse nurodytos teigiamos kontrolinės medžiagos, tačiau neįtraukiamos neigiamos / nešabloninės kontrolinės medžiagos (NTC). NTC reikia pridėti prie planuojamo tyrimo kaip papildomą mėginį.

Jei naudojate „TSO Comprehensive (EU)“, norėdami nustatyti RNR ir (arba) DNR bibliotekų, kurias reikia sekvenuoti vienoje pratekamojoje kiuvetėje, skaičių, vadovaukitės [Lentelė 7](#) ir [Lentelė 8](#) pateiktomis gairėmis. Žr., [Lentelė 7](#) jei atskirai sekvenuojate RNR arba DNR bibliotekas. Žr., [Lentelė 8](#) jei atskirai sekvenuojate RNR ir DNR bibliotekas toje pačioje pratekamojoje kiuvetėje.

Lentelė 7 RNR arba DNR bibliotekų sekvenavimas

Bibliotekos tipas	Minimalus	Maksimalus*
Tik RNR	3	16
Tik DNR	3	8

* NTC neprideda prie sudėtingumo.

Lentelė 8 RNR ir DNR bibliotekų sekvenavimas toje pačioje pratekamojoje kiuvetėje

Bibliotekos tipas	Minimalus	Maksimalus*
RNR	3	8
DNR	3	8

* NTC neprideda prie sudėtingumo.

Siekiant *optimalaus* reagentų naudojimo sekvenuojant DNR ir RNA bibliotekas su „TSO Comprehensive (EU)“, esančias „NextSeq 550Dx instrument“, sekvenuokite 8 RNR bibliotekas ir 8 DNR bibliotekas vienoje pratekamojoje kiuvetėje.

Indekso pradmenys unikalčiai identifikuoja kiekvieną mėginį, kad bibliotekas būtų galima sujungti į vieną pratekamąją kiuvetę sekvenuoti. Atliekant serijos paruošimą „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis, suderinami indeksų deriniai rodomi ekrane „Create Run“ (kurti seriją). Ruošdami biblioteką, prie kiekvienos mėginių bibliotekos pridėkite indekso pradmenį. *Kiekvienai mėginių bibliotekai naudokite skirtingą indekso pradmenų mišinį.*

Įsitikinkite, kad indekso pradmenys, kuriuos naudojate su mėginiais, atitinka indeksus, kuriuos pasirinkote analizei naudojant „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis. *Dėl nesutapimų gaunamas klaidingas rezultatas dėl teigiamo mėginio identifikavimo praradimo.*

„TSO Comprehensive (EU)“ tyrime yra dviejų tipų indeksai.

- **UPxx indeksai** — naudokite UPxx indeksus bibliotekoms, gautoms iš RNR arba DNR mėginių.
- **CPxx indeksai** — naudokite CPxx indeksus bibliotekoms, gautoms iš DNR mėginių. Nenaudokite CPxx indeksų bibliotekoms, gautoms iš RNR, arba jeigu iš viso sekvenuojamos trys DNR bibliotekos.

Sekvenuojant tik tris bibliotekas, būtina laikytis tolesnių reikalavimų:

- Bibliotekos turi būti vien DNR arba vien RNR.
- Nenaudokite CPxx indeksų rinkinių.
- Norint užtikrinti pakankamą įvairovę, reikalingas vienas iš toliau nurodytų UPxx indeksų rinkinių:
 - UP01, UP02 ir UP03
 - UP04, UP05 ir UP06
 - UP07, UP08 ir UP09
 - UP10, UP11 ir UP12

Pavyzdžiui, pirmajai bibliotekai priskiriama UP01, antrajai – UP02, o trečiajai – UP03.

„TruSight Oncology“ kontrolės

„TSO Comprehensive (EU)“ reikalauja naudoti „TruSight Oncology“ kontrolės, kurį sudaro „TruSight Oncology“ DNR kontrolė ir „TruSight Oncology“ RNR kontrolė kaip teigiama kontrolinė medžiaga. Į kiekvieną DNR sekvenavimo seriją įtraukite „TruSight Oncology“ DNR kontrolę, o į kiekvieną RNR sekvenavimo seriją įtraukite „TruSight Oncology“ RNR kontrolę konkrečiu bibliotekos paruošimo atveju (taip pat įtraukite kombinuotą DNR ir RNR tyrimų kontrolines medžiagas). Kiekvienai planuojamai sekvenavimo serijai yra parengta unikali teigiama kontrolė.

Į kiekvieną RNR ir kiekvieną DNR bibliotekos paruošimo atvejį įtraukite atitinkamą NTC. NTC yra pakartotinai sekvenuojamas vienu bibliotekos paruošimo atveju. Laikykites šių „TruSight Oncology“ kontrolės skirtų gairių:

- Bibliotekas paruoškite iš teigiamų kontrolinių medžiagų ir nešabloninių kontrolinių medžiagų, identiška mėginams.
- DNR NTC naudokite TEB.
- RNR NTC naudokite „RNase/DNase-free water“.
- Teigiamos kontrolės įtraukiamos į maksimalius bibliotekos reikalavimus.
- NTC neįtrauktos į minimalius bibliotekos reikalavimus.
- Kai sekvenuojate 3 bibliotekas, naudokite NTC skirtus UP indeksus.
- Kadangi NTC sekvenuojama pakartotinai, šiai kontrolei pasirinkti indeksai negali būti kartojami bibliotekos paruošimo atveju.

Toliau esančiose lentelėse pateikiami pavyzdiniai plokštelių išdėstymai, skirti bibliotekoms paruošti. Kiekvienas numeruotas stulpelis atitinka vieną sekvenavimo seriją. Sekvenuojant DNR ir RNR bibliotekas kartu, kiekvienas atitinkamas stulpelių rinkinys atitinka vieną sekvenavimo seriją (pvz., 1 ir 7 stulpelis). NTC sekvenuojamas pagal kiekvieną stulpelį arba stulpelių rinkinį.

Lentelė 9 Bibliotekos paruošimo atvejis vienai serijai, įskaitant šešis pacientų mėginius

	1	2	3	4	5	6	7
A	Teigiama DNR kontrolė	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	Teigiama RNR kontrolė
B	DNR 1	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	RNR 1
C	DNR 2	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	RNR 2
D	DNR 3	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	RNR 3
E	DNR 4	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	RNR 4
F	DNR 5	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	RNR 5
G	DNR 6	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	RNR 6
H	DNR NTC	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	tuščia	RNR NTC

Lentelė 10 Bibliotekos paruošimo trijų serijų atvejis, įskaitant 20 pacientų mėginių

	1	2	3	4	5	6	7
A	Teigiama DNR kontrolė	Teigiama DNR kontrolė	Teigiama DNR kontrolė	tuščia	Teigiama RNR kontrolė	Teigiama RNR kontrolė	Teigiama RNR kontrolė
B	DNR 1	DNR 7	DNR 14	tuščia	RNR 1	RNR 7	RNR 14
C	DNR 2	DNR 8	DNR 15	tuščia	RNR 2	RNR 8	RNR 15
D	DNR 3	DNR 9	DNR 16	tuščia	RNR 3	RNR 9	RNR 16
E	DNR 4	DNR 10	DNR 17	tuščia	RNR 4	RNR 10	RNR 17
F	DNR 5	DNR 11	DNR 18	tuščia	RNR 5	RNR 11	RNR 18
G	DNR 6	DNR 12	DNR 19	tuščia	RNR 6	RNR 12	RNR 19
H	DNR NTC	DNR 13	DNR 20	tuščia	RNR NTC	RNR 13	RNR 20

Naudojimo instrukcija

„TSO Comprehensive (EU)“ darbo eigos apžvalga pateikiama [Pav. 1](#) ir [Pav. 2](#)

Bibliotekos paruošimo darbo eiga

[Pav. 1](#) pavaizduota bibliotekos paruošimo darbo eiga, skirta „TSO Comprehensive (EU)“. Bibliotekas iš RNR ir DNR mėginių galima paruošti vienu metu atskiruose šulinėliuose. Teigiamos ir nešabloninės kontrolinės medžiagos mėginiams apdorojamos identišškai. Saugūs sustojimo taškai pažymėti tarp žingsnių.

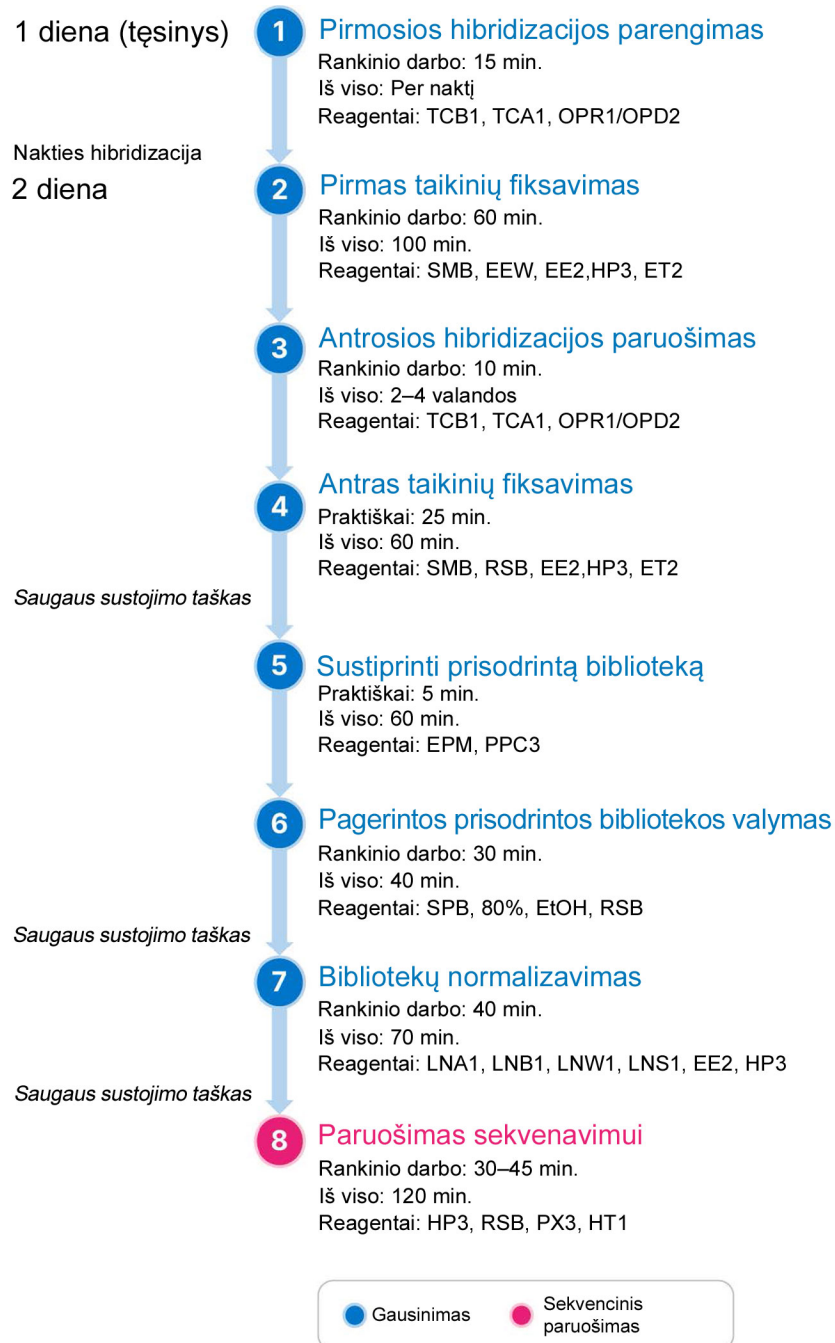
Prieš paleisdami protokolą, įveskite serijos ir mėginio informaciją į „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ analizės modulis. Žr. „*Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module*“ darbo eigos žinynas (dokumento Nr. 200008661).

Pav. 1 „TSO Comprehensive (EU)“ Darbo eiga (1 dalis)

Sodrinimo darbo eiga

Pav. 2 pavaizduota sodrinimo darbo eiga, skirta „TSO Comprehensive (EU)“. Saugūs sustojimo taškai pažymėti tarp žingsnių.

Pav. 2 „TSO Comprehensive (EU)“ Darbo eiga (2 dalis)



Programų šiluminiai ciklai

Prieš pradėdami tyrimą, išsaugokite toliau nurodytas programas, skirtas preamplifikacijos ir poamplifikacijos termocikleriams.

Lentelė 11 Preamplifikacijos termociklių programos

Procedūrinis žingsnis	Programos pavadinimas	Dangčio temperatūra	Reakcijos tūris	Termociklerio parametrai
RNR denatūravimas ir aneliavimas	LQ-RNA	100 °C	17 µl	65 °C 5 minutėms 4 °C 1 minutei - Laikykite 4 °C temperatūroje
Pirmosios grandinės kDNR susintetinimas	1stSS	100 °C	25 µl	25 °C 10 minučių 42 °C 15 minučių 70 °C 15 minučių 4 °C 1 minutei - Laikykite 4 °C temperatūroje
Antrosios grandinės kDNR susintetinimas	2ndSS	30 °C	50 µl	16 °C 25 minutėms 4 °C 1 minutei - Laikykite 4 °C temperatūroje

PASTABA Jeigu 2ndSS dangčio temperatūros negalima nustatyti iki 30 °C, išjunkite šildomojo dangčio kaitinimo parinktį.

Lentelė 12 Poamplifikacijos termociklių programos

Procedūrinis žingsnis	Programos pavadinimas	Dangčio temperatūra	Reakcijos tūris	Termociklerio parametrai
PCR indeksavimas	I-PCR	100 °C	50 µl	98 °C 30 sekundžių 15 ciklų: 98 °C 10 sekundžių 60 °C 30 sek. 72 °C 30 sekundžių 72 °C 5 minutėms - Laikykite 10 °C temperatūroje.
Atlikite pirmąją hibridizaciją	HYB1	100 °C	50 µl	95 °C 10 minučių 85 °C 2 minutėms ir 30 sekundžių 75 °C 2 minutėms ir 30 sekundžių 65 °C 2 minutėms ir 30 sekundžių - Laikykite 57 °C temperatūroje nuo 8 iki 24 valandų

Procedūrinis žingsnis	Programos pavadinimas	Dangčio temperatūra	Reakcijos tūris	Termociklerio parametrai
Antroji hibridizacija	HYB2	100 °C	50 µl	95 °C 10 minučių 85 °C 2 minutėms ir 30 sekundžių 75 °C 2 minutėms ir 30 sekundžių 65 °C 2 minutėms ir 30 sekundžių - Laikykite 57 °C temperatūroje nuo 1,5 iki 4 valandų
Sustiprinti prisodrintą biblioteką	EL-PCR	100 °C	50 µl	98 °C 30 s 18 ciklų: 98 °C 10 s 60 °C 30 s 72 °C 30 s 72 °C 5 min. - Laikykite 10 °C temperatūroje.

Pasiruošimas protokolo veiksmams

- Kruopščiai nukenksminkite darbo vietas naudodami ribonukleazės / deoksiribonukleazės slopinantį valiklį.



DĖMESIO!

Visoms darbo eigos procedūroms reikalinga aplinka be ribonukleazių / deoksiribonukleazių.

- Įsitikinkite, kad nustatytos preamplifikacijos termociklerio programos. Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
- Norėdami paruošti ultragarso aparatą, vadovaukitės jo gamintojo nurodymais.
- Jeigu apdorojate tik DNR mėginius, pereikite prie skyriaus [Fragmento gDNR 49 psl.](#)
- Išimkite RNR kontroles iš laikymo vietos.
- Išimkite reagentų mėgintuvėlius iš dėžutės ir vykdykite atšildymo nurodymus.

Lentelė 13 „TruSight Oncology Comp RNA Library Prep“ (PN 20031127)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
EPH3	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildymas iki kambario temperatūros	RNR denatūravimas ir aneliavimas
FSM	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildymas iki kambario temperatūros	Pirmosios grandinės kDNR susintetinimas
RVT	Nuo -25 iki -15 °C	Laikykite šaltai	Pirmosios grandinės kDNR susintetinimas
SSM	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildymas iki kambario temperatūros	Antrosios grandinės kDNR susintetinimas

Lentelė 14 „TruSight Oncology Comp Library Prep“ (laikyti šaldytuve) (PN 20031119)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
SPB (šviesiai žalia etiketė)	2–8 °C	Palikite 30 minučių, kol pasieks kambario temperatūrą.	kDNR valymas
RSB	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	kDNR valymas

RNR denatūravimas ir aneliavimas

Šis procesas denatūroja išgrynintą RNR ir pirminius sluoksnius su atsitiktiniais heksamerais, ruošiantis kDNR suliejimui.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - EPH3 – atidėkite.
 - FSM – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu. Trumpai centrifuguokite, tada sumaišykite pipetuodami. Reagente gali būti su preparatu susijusių baltų dalelių. Nieko daryti nereikia. Nėra jokio poveikio preparato veiksmingumui.
 - RVT – trumpai centrifuguokite, tada sumaišykite pipetuodami. Laikykite šaltai.

PASTABA RVT yra klampus tirpalas. Pipetuodami stenkitės nesudaryti burbuliukų.

2. Mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje sumaišykite toliau nurodytus kiekius, kad paruoštumėte „FSM + RVT Master Mix“.

Lentelė 15 „FSM + RVT Master Mix“

„Master Mix“ komponentas	4 bibliotekos (μl)	8 bibliotekos (μl)	16 bibliotekų (μl)	24 bibliotekos (μl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

Šioje lentelėje pateikiamas tūrio paviršius. Skaičiavimai pateikti skyriuje [Reagentų naudojimas 33 psl.](#)

3. Pipetuokite 10 kartų, kad sumaišytumėte.
4. „FSM + RVT Master Mix“ laikykite šaltai, kol [Pirmosios grandinės kDNR susintetinimas 45 psl.](#)

Procedūra

1. Atšildydami ekstrahuotus RNR mėginius ir RNR kontrolines medžiagas laikykite šaltai. Likusią protokolo dalį RNR kontrolės apdorokite kaip mėginius.

2. Kai nenaudojate, RNR laikykite šalta. Norėdami kiekybiškai įvertinti mėginius, žr. [Mėginiui taikomi reikalavimai 26 psl.](#)
3. Kiekvieną RNR mėginį sumaišykite pipetuodami 10 kartų.
4. Naudokite „RNase/DNase-free water“ kad paruoštumėte 40 ng kiekvieno RNR mėginio, kurio galutinis tūris yra 8,5 µl (4,7 ng/µl).
RNR kontrolei naudokite mėgintuvėlio etiketėje nurodytą koncentraciją.
5. Pažymėkite naują 96 šulinėlių PCR plokštelę CF (kDNR fragmentai).
6. Į unikalų CF PCR plokštelės šulinėlį įpilkite 8,5 µl kiekvieno RNR mėginio.
7. Įsitikinkite, kad paruošimo metu mėginio plokštelės išdėstymas ir kiekvieno mėginio indeksai atitinka „TSO Comprehensive (EU)“ analizės modulis planuojamą seriją.
8. Išmaišykite EPH3 sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
9. Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilkite 8,5 µl EPH3.
10. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CF PCR plokštelės.



DĖMESIO!

Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.

11. 1 minutę purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
12. Centrifuguokite 280 × g 1 minutę.
13. Padėkite ant termociklerio ir paleiskite LQ-RNA programą.
Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
14. Kai mėginiai pasiekia 4 °C temperatūrą, palaikykite 1 minutę. Nedelsdami pereikite prie kito veiksmo.

Pirmosios grandinės kDNR susintetinimas

Šis procesas atvirkštine tvarka perrašo RNR fragmentus, pirmojoje kDNR gijoje užpildytus atsitiktiniais heksameriais, naudojant Reverse Transcriptase.

Procedūra

1. CF PCR plokštelę išimkite iš termociklerio.
2. Pipete 10 kartų sumaišykite „FSM + RVT Master Mix“. Įsitikinkite, kad FSM + RVT mišinys yra visiškai homogeniškas.
3. Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilkite 8 µl „FSM + RVT Master Mix“.
4. Pipetuokite 10 kartų, kad sumaišytumėte.
5. Išmeskite likusį „FSM + RVT Master Mix“.
6. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CF PCR plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
7. 1 minutę purtykite 1 200 aps./min. greičiu.

8. Centrifuguokite $280 \times g$ 1 minutę.
9. Padėkite ant termociklerio ir paleiskite 1stSS programą.
Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
10. Kai mėginiai pasiekia 4°C temperatūrą, nedelsdami pereikite prie kito veiksmo.
Pirmuosius gijų mėginius galima laikyti 4°C temperatūroje iki 5 minučių.

Antrosios grandinės kDNR susintetinimas

Šis procesas pašalina RNR šabloną ir susintetina dvigrandę kDNR.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytą reagentą.
 - SSM – 10 kartų apverskite, kad sumaišytumėte. Trumpai centrifuguokite.

Procedūra

1. CF PCR plokštelę išimkite iš termociklerio.
2. Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilkite 25 μl SSM.
3. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CF PCR plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
4. 1 minutę purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
5. Centrifuguokite $280 \times g$ 1 minutę.
6. Padėkite ant termociklerio ir paleiskite 2ndSS programą.
Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
7. Kai mėginiai pasiekia 4°C temperatūrą, palaikykite 1 minutę ir nedelsdami pereikite prie kito veiksmo.

kDNR valymas

Šioje procedūroje SPB naudojamas nepageidaujamų reakcijų komponentams išvalyti iš kDNR. Granulės du kartus plaunamos šviežiu 80 % etanolio. kDNR yra eliuuojama su RSB.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - SPB – įsitikinkite, kad granulės kambario temperatūroje pabus 30 minučių.
 - RSB – atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.
2. 15 ml arba 50 ml kūginiame mėgintuvėlyje paruoškite šviežio 80 % etanolio, kaip nurodyta toliau.

Lentelė 16 Paruoškite šviežią 80 % etanolį

Reagentas	4 bibliotekos	8 bibliotekos	16 bibliotekų	24 bibliotekos
100 % etanolis, grynas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
„RNase/DNase-free water“	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Šviežią 80 % etanolį sumaišykite centrifuguodami.
4. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelę BIND1 (kDNR surišimas).
5. Uždenkite ir padėkite į šalį.
6. Nustatykite magnetą.

Procedūra

Surišimas

1. CF PCR plokštelę išimkite iš termociklerio.
2. SPB maišykite 1 minutę, kad vėl suspenduotumėte granules.
3. Nedelsdami į kiekvieną BIND1 MIDI plokštelės mėginio šulinėlį įpilkite 90 µl SPB.
Jeigu SPB išpilti naudojate lovelį, skirdami pakankamą medžiagos alikvotą mėginiui, taikykite 1,05 paviršiaus koeficientą. Kai į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilama SPB, visas likusias medžiagas išmeskite.
4. Visą kiekvieno mėginio iš CF PCR plokštelės kiekį (50 µl) perpilkite į atitinkamą BIND1 MIDI plokštelės šulinėlį.
5. Išmeskite tuščią CF PCR plokštelę.
6. Užklijuokite lipnų sandariklį ant BIND1 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
7. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
8. Inkubuokite 5 min. kambario temperatūroje.
9. Padėkite BIND1 MIDI plokštelę ant magnetinio stovo 5 minutėms.
10. Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno mėginio šulinėlio, nesutrikdydami granulių sankaupos.

Plovimas

1. Nuplaukite granules taip, kaip nurodyta toliau.
 - a. Palaikykite BIND1 MIDI plokštelę ant magnetinio stovo ir į kiekvieną šulinėlį įpilkite po 200 µl šviežio 80 % etanolio.
 - b. Palaukite 30 sekundžių.
 - c. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno mėginio šulinėlio, nesutrikdydami granulių sankaupos.
2. **Antrą** kartą plaukite granules.
3. Pipete su smulkiais antgaliais pašalinkite etanolio likučius iš kiekvieno šulinėlio.
4. Įpilkite nepanaudotą 80 % etanolį.

Eliutas

1. Išimkite BIND1 MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
2. Apverskite arba išmaišykite RSB sūkuriniu maišytuvu.
3. Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilkite 22 µl RSB.
4. Užklijuokite lipnų sandariklį ant BIND1 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
5. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
6. Inkubuokite 2 min. kambario temperatūroje.
7. Padėkite ant magnetinio stovo 2 minutėms.
8. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelę „PCF“ (išgryninti kDNR fragmentai).
Jeigu sustabdote tyrimą ties [SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS 48 psl.](#), naudokite PCR plokštelę.
9. 20 µl eliuato iš kiekvieno BIND1 MIDI plokštelės mėginio šulinėlio perpilkite į atitinkamą PCF plokštelės šulinėlį.
10. Išmeskite tuščią BIND1 MIDI plokštelę.
11. Į kiekvieną PCF plokštelės mėginio šulinėlį įpilkite 30 µl RSB.
12. Pipetuokite 10 kartų, kad sumaišytumėte.
13. Užklijuokite lipnų sandariklį ant PCF plokštelės ir laikykite šaltai.
14. Grąžinkite EPH3, FSM, RVT ir SSM į laikymo vietą.
15. Jei apdorojate mėginius, gautus tik iš RNR (cDNA), ir nesustojate saugaus sustojimo taške, pereikite prie [Atlikite galų taisymą ir poliadenilimą 52 psl.](#)

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jeigu sustabdote tyrimą, 1 minutę centrifuguokite PCF PCR plokštelę 280 × g ir laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 7 dienų.

Pasiruošimas protokolo veiksmams

1. Išimkite DNR kontroles iš laikymo vietos.
2. Išimkite reagentų mėgintuvėlį iš dėžutės ir vykdykite atšildymo nurodymus.

Lentelė 17 „TruSight Oncology Comp Library Prep“ (laikyti šaldytuve) (PN 20031119)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
TEB	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Fragmento gDNR

Fragmento gDNR

Šis procesas fragmentuoja gDNR ir generuoja dsDNR fragmentus su 3' arba 5' iškyšomis.

Paruošimas

1. Laikykitės [Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl.](#), kad galėtumėte atlikti kiekybinį mėginių ištyrimą.
2. Paruoškite toliau nurodytą reagentą:
 - TEB – apverskite arba sukite, kad sumaišytumėte.

Procedūra

Paruoškite plokštelę

1. Pasirinkite vieną iš šių variantų, kad paruoštumėte plokštelę:
 - **1 variantas:** Apdorokite gDNR mėginius kartu su kDNR mėginiais PCF MIDI plokštelėje.
 - a. Pažymėkite PCF MIDI plokštelę LP (Bibliotekos paruošimas).
 - b. Padėkite į šalį ir laikykite šaltai, kad galėtumėte naudoti [Suskaitytos DNR perkėlimas 50 psl.](#)
 - **2 variantas:** Apdorokite gDNR mėginius kartu su kDNR mėginiais ir PCF PCR plokštelė yra užšaldoma.
 - a. Atšildykite PCF PCR plokštelę iki kambario temperatūros.
 - b. Centrifuguokite 280 × g 1 minutę.
 - c. Pipetuokite 10 kartų, kad sumaišytumėte.
 - d. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelę LP (Bibliotekos paruošimas).
 - e. Visus 50 µl kiekvieno mėginio iš PCF PCR plokštelės perpilkite į atitinkamą LP MIDI plokštelės šulinėlį.
 - f. Išmeskite PCF PCR plokštelę.
 - g. Užklijuokite lipnų sandariklį ir laikykite šaltai, kol atliksite [Suskaitytos DNR perkėlimas 50 psl.](#)
 - **3 variantas:** Apdorokite tik gDNR mėginius.
 - a. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelę LP (Bibliotekos paruošimas).

Jeigu sustabdote tyrimą ties [SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS 51 psl.](#), naudokite PCR plokštelę.

- b. Uždenkite ir padėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti [Suskaidytos DNR perkėlimas 50 psl.](#)

Praskieskite gDNR

- Atšildykite DNR mėginius ir DNR kontrolės kambario temperatūroje.
- Kiekvieną gDNR mėginį sumaišykite pipetuodami 10 kartų.
- Trumpai centrifuguokite mėgintuvėlį, kad surinktumėte lašelius.
- Apverskite arba sukite TEB, kad sumaišytumėte.
- Naudokite TEB, kad paruoštumėte galutinį kiekvieno gDNR mėginio 52 µl tūrį. Informacijos apie įdedamus kiekius ir minimalias koncentracijas pagal mėginio tipą žr. toliau pateiktoje lentelėje.
 - Norint atlikti tyrimą, reikia minimalios išskyrimo koncentracijos, kad būtų galima paimti bent 40 µl TEB iš 52 µl tūrio.
 - DNR kontrolės naudokite mėgintuvėlio etiketėje nurodytos koncentracijos.
 - Kad mėginys nebūtų prarastas, į šį skiedimą nepipetuoti mažiau kaip 2 µl mėginio kiekio.

Mėginio tipas	Įdedamas kiekis (ng)	Minimali koncentracija (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrolė	40	Žr. mėgintuvėlio etiketę

Fragmentas

- Į atskirą ultragarsinio tyrimo mėgintuvėlio šulinėlį įpilkite 52 µl kiekvieno gDNR mėginio.



DĖMESIO!

Lėtai įdėkite gDNR į mėgintuvėlį, įsitikinkite, kad mėgintuvėlio apačioje nėra oro tarpų. Daugiau informacijos žr. [Ištyrimas 29 psl.](#) ir gamintojo instrukcijoje.

- Įrašykite juostelės orientaciją.
- Su ultragarso aparatu suskaidykite gDNR į fragmentus.

Suskaidytos DNR perkėlimas

- Įsitikinkite, kad kiekvieno mėginio mėginių plokštelės išdėstymas ir indeksai atitinka tyrimą, kurį pasirenkate analizei, naudodami „TSO Comprehensive (EU)“ analizės modulis.
- Norėdami išimti mėginį, vadovaukitės ultragarso aparato gamintojo nurodymais.
Kai kurių tipų ultragarso mėgintuvėliams centrifuguoti gali prireikti, kad mėginys būtų konsoliduotas mėgintuvėlyje.
- Kiekvienam fragmentuotam gDNR mėginiui naudokite pipetę su smulkiais antgaliais, kad tris kartus po 16,7 µl perkeltumėte į tuščią LP MIDI plokštelės šulinėlį.

4. Užklijuokite lipnų sandariklį ant LP MIDI plokštelės.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jeigu sustabdote tyrimą, užklijuokite lipnų plokštelės sandariklį ant LP PCR plokštelės ir 1 minutę centrifuguokite 280 × g. Laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 7 dienų.

Pasiruošimas protokolo veiksmams

Įsitikinkite, kad nustatytos poamplifikacijos termociklerio programos. Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)

1. Paruoškite ledo kibirą arba jo ekvivalentą.
2. Išimkite reagentų mėgintuvėlį iš dėžutės ir vykdykite atšildymo nurodymus.

Lentelė 18 „TruSight Oncology Comp Library Prep“ (užšaldytas) dėžutė (PN 20031118)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
ERA1-A	Nuo -25 iki -15 °C	Laikykite šaltai.	Atlikite galų taisymą ir poliadenilinimą
ERA1-B	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Atlikite galų taisymą ir poliadenilinimą
ALB1	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Ligatų adapteriai
LIG3	Nuo -25 iki -15 °C	Laikykite šaltai.	Ligatų adapteriai
SUA1 (mėlynas dangtelis)	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Ligatų adapteriai
UMI (baltas dangtelis)	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Ligatų adapteriai
STL	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Ligatų adapteriai
EPM	Nuo -25 iki -15 °C	Laikykite šaltai.	PCR indeksavimas

Lentelė 19 „TruSight Oncology Comp Library Prep“ (laikyti šaldytuve) dėžutė (PN 20031119)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
SPB (šviesiai žalia etiketė)	2–8 °C	Palikite 30 minučių, kol pasieks kambario temperatūrą.	Ligavimo išvalymas
RSB	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Ligavimo išvalymas

Lentelė 20 „TruSight Oncology Comp UP Index Primers“ dėžutė (PN 20031120)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
UPxx	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite atitinkamus indekso pradmenų mėgintuvėlius iki kambario temperatūros.	PCR indeksavimas

Lentelė 21 „TruSight Oncology Comp CP Index Primers“ dėžutė (PN 20031126)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
CPxx	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite atitinkamus indekso pradmenų mėgintuvėlius iki kambario temperatūros.	PCR indeksavimas

Atlikite galų taisymą ir poliadenilinimą

Šis procesas ištaiso iškyšas, atsirandančias dėl suskaidymo į galus su išsikišusia A uodega, naudojant „End Repair A-Tailing Master Mix“ (ERA1).

Šio mišinio 3'–5' egz nukleazės aktyvumas pašalina 3' iškyšas, o 5'–3' polimerazės aktyvumas užpildo 5' iškyšas. Šios reakcijos metu 3' galai yra poliadenilinami, kad nebūtų liguojami vienas su kitu adapterio ligavimo reakcijos metu.

Paruošimas

- Įkaitinkite 2 mikromėginių inkubatorius MIDI šildymo bloko intarpais, kaip nurodyta toliau.
 - Įkaitinkite mikromėginių inkubatorių iki 30 °C temperatūros.
 - Įkaitinkite mikromėginių inkubatorių iki 72 °C temperatūros.
- Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - ERA1-A – trumpai centrifuguokite, tada sumaišykite pipetudami. Laikykite šaltai.
 - ERA1-B – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Patikrinkite, ar nėra nuosėdų. Jeigu yra, pašildykite mėgintuvėlį iki 37 °C temperatūros, tada sumaišykite pipetudami, kol nuosėdos ištirps.
- Paruoškite „ERA1 Master Mix“ mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje.

Lentelė 22 „ERA1 Master Mix“¹

„Master Mix“ komponentas	4 bibliotekos	8 bibliotekos	16 bibliotekų	24 bibliotekos	48 bibliotekos
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

¹ Šioje lentelėje įtrauktas kiekio perviršis. Skaičiavimai pateikti skyriuje [Reagentų naudojimas 33 psl.](#)

- Lėtai pipetukite 10 kartų, kad užtikrintumėte homogeniškumą, tada trumpai centrifuguokite. „ERA1 Master Mix“ laikykite šaltai.
- Norėdami paruošti plokštelę, pasirinkite vieną iš šių variantų:
 - 1 variantas:** Jei mėginiai yra MIDI plokštelėje, paruoškite taip.

- Iš naujo pažymėkite MIDI plokštelę „LP2“ (2 bibliotekos paruošimas).
- Jeigu kai kurie mėginiai yra atskirose MIDI plokštelėse, perkelti visus mėginius, kad atskirtumėte tos pačios MIDI plokštelės šulinėlius pagal plokštelės išdėstymą.
- **2 variantas:** Jei plokštelė užšalusi, paruoškite taip.
 - a. Atšildykite PCF PCR arba LP PCR plokštelę iki kambario temperatūros.
 - b. Plokštelę 1 minutę centrifuguokite 280 × g.
 - c. Pipetuokite 10 kartų, kad sumaišytumėte.
 - d. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelę LP2 (Bibliotekos paruošimas 2).
 - e. Visus 50 µl kiekvieno mėginio iš PCF PCR arba LP PCR plokštelės perpilkite į atitinkamą LP2 MIDI plokštelės šulinėlį.
 - f. Išmeskite PCF PCR arba LP PCR plokštelę.

Procedūra

1. Į kiekvieną LP2 MIDI plokštelės mėginio šulinėlį įpilkite 10 µl „ERA1 Master Mix“.
2. Išmeskite likusį „ERA1 Master Mix“.
3. Užklijuokite lipnų sandariklį ant LP2 MIDI plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
4. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
5. 30 minučių inkubuokite iš anksto pašildytame mikromėginių inkubatoriuje 30 °C temperatūroje.
6. Nedelsdami perkelti į antrą pašildytą mikromėginių inkubatorių.
7. Inkubuokite 72 °C temperatūroje 20 minučių.
8. Palaikykite LP2 MIDI plokštelę šaltai 5 minutes.

Ligatų adapteriai

Šis procesas liguoja adapterius prie kDNR ir (arba) gDNR fragmentų galų.

„TSO Comprehensive (EU)“ tyrimas apima SUA1 ir UMI adapterius.

- Su RNR mėginiais naudokite SUA1 adapterius.
- UMI adapterius naudokite su DNR mėginiais.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - ALB1 – mažiausiai 10 s maišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - LIG3 – trumpai centrifuguokite, tada sumaišykite pipetudami. Laikykite šaltai.
 - SUA1 – mažiausiai 10 s maišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.

- UMI – mažiausiai 10 s maišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
- STL – atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.

Procedūra

1. LP2 MIDI plokštelę išimkite iš ledo ar jo ekvivalento.
2. Į kiekvieną LP2 MIDI plokštelės šulinėlį įpilkite 60 µl ALB1, ALB1 yra klampus tirpalas. Pipetuokite lėtai, kad kuo mažiau susidarytų burbuliukų.
3. Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilkite 5 µl LIG3.
4. Pridėkite adapterius taip, kaip nurodyta toliau.
Nenaudokite kartu skirtingų tipų adapterių.
 - **RNR mėginių šulinėliai** – 10 µl SUA1 (mėlynas dangtelis) kiekvienam iš RNR gautam mėginiui.
 - **DNR mėginių šulinėliai** – 10 µl UMI (baltas dangtelis) kiekvienam iš DNR gautam mėginiui.
5. Užklijuokite lipnų sandariklį ant LP2 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
6. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
7. Inkubuokite 30 min. kambario temperatūroje.
8. Išmaišykite STL sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
9. Į kiekvieną LP2 MIDI plokštelės šulinėlį įpilkite 5 µl STL.
10. Užklijuokite lipnų sandariklį ant LP2 MIDI plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
11. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.

Ligavimo išvalymas

Šis procesas naudoja SPB, kad išgrynintų su adapteriu susietus kDNR arba gDNR fragmentus ir pašalintų nepageidaujamus produktus. Granulės du kartus plaunamos šviežiu 80 % etanolio. Su adapteriu susieti mėginiai eliuuojami naudojant RSB.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - SPB – įsitikinkite, kad granulės kambario temperatūroje pabūs 30 minučių.
 - RSB – atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.
2. Paruoškite šviežio 80 % etanolio 15 ml arba 50 ml kūginiame mėgintuvėlyje.

Lentelė 23 Paruoškite šviežio 80 % etanolio

Reagentas	4 bibliotekos	8 bibliotekos	16 bibliotekų	24 bibliotekos	48 bibliotekos
100 % etanolis, grynas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
„RNase/DNase-free water“	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Šviežią 80 % etanolį sumaišykite centrifuguodami.
4. Nustatykite magnetą.

Procedūra

Surišimas

1. SPB maišykite 1 minutę, kad vėl suspenduotumėte granules.
2. Nedelsdami į kiekvieną LP2 MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 112 µl SPB.
Jeigu SPB išpilti naudojate lovėlį, skirdami pakankamą medžiagos alikvotą mėginiui, taikykite 1,05 paviršiaus koeficientą. Kai į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilama SPB, visas likusias medžiagas išmeskite.
3. Užklijuokite lipnų sandariklį ant LP2 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
4. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
5. Inkubuokite 5 min. kambario temperatūroje.
6. LP2 MIDI plokštelę palikite ant magnetinio stovo 10 minučių.
7. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno mėginio šulinėlio, nesutrikdydami granulių sankaupos.

Plovimas

1. Nuplaukite granules taip, kaip nurodyta toliau.
 - a. Laikykite LP2 MIDI plokštelę ant magnetinio stovo ir į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilkite 200 µl šviežio 80 % etanolio.
 - b. Palaukite 30 sekundžių.
 - c. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno mėginio šulinėlio, nesutrikdydami granulių sankaupos.
2. **Antrą** kartą plaukite granules.
3. Pipete su smulkiais antgaliais pašalinkite etanolio likučius iš kiekvieno šulinėlio.
4. Įpilkite nepanaudotą 80 % etanolį.

Eliutas

1. Išimkite LP2 MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
2. Apverskite arba išmaišykite RSB sūkuriniu maišytuvu.
3. Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilkite 27,5 µl RSB.
4. Užklijuokite lipnų sandariklį ant LP2 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
5. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
6. Inkubuokite 2 min. kambario temperatūroje.
7. Padėkite LP2 MIDI plokštelę ant magnetinio stovo 2 minutėms.
8. Pažymėkite naują 96 šulinėlių PCR plokštelę kaip LS (Bibliotekų mėginiai).
9. Perpilkite po 25 µl kiekvieno eliuato iš LP2 MIDI plokštelės į atitinkamą LS PCR plokštelės šulinėlį.
10. Išmeskite tuščią LP2 MIDI plokštelę.

PCR indeksavimas

Šiame etape bibliotekos fragmentai amplifikuojami naudojant pradmenis, kurie prideda indeksų sekas mėginių dauginimui. Gautame preparate yra visa kDNR ir (arba) DNR fragmentų biblioteka su adapteriais, reikalingais klasterių gamybai.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - EPM – Laikykite šaltai.
 - UPxx – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. UPxx yra indekso pradmuo, per paruošimą pasirinktas programinės įrangos „Local Run Manager“ ekrane „Create Run“ (kurti seriją).

- CPxx – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. CPxx yra indekso pradmuo, per paruošimą pasirinktas programinės įrangos „Local Run Manager“ ekrane „Create Run“ (sukurti seriją).
2. Įsitinkite, kad paruošimo metu kiekvieno mėginio indeksai atitinka „TSO Comprehensive (EU)“ analizės modulis planuojamą seriją. Būtinai laikykitės indeksų pasirinkimo nurodymų skyriuje [Bibliotekų skaičius ir indeksų pasirinkimas 36 psl.](#)



DĖMESIO!

Nesutapus mėginių ir indeksavimo pradmenims gaunamas klaidingas rezultatas dėl teigiamo mėginio identifikavimo praradimo.

Procedūra

1. Į atitinkamą mėginio šulinėlį LS PCR plokštelėje įpilkite 5 µl atitinkamo indekso pradmens (UPxx arba CPxx) pagal pasirinktus indeksus.



DĖMESIO!

Vienu metu imkite ir atidarykite tik vieną indekso pradmens mėgintuvėlį. Kiekvieną indeksinį mėgintuvėlį iškart po naudojimo uždenkite nauju dangteliu. Nejunkite indeksinių pradmenų kartu.

2. EPM pamaišykite 5 sekundes, tada trumpai centrifuguokite.
3. Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpilkite 20 µl EPM.
4. Užklijuokite lipnų sandariklį ant LS PCR plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
5. 1 minutę purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
6. Grąžinkite preamplifikacijos reagentus į laikymo vietą.



DĖMESIO!

Norėdami išvengti amplifikacijos preparato pernašos, visus tolesnius veiksmus atlikite poamplifikacijos srityje.

7. LS PCR plokštelę 1 minutę centrifuguokite 280 × g.
8. Bibliotekų plokštelę padėkite ant iš anksto užprogramuoto poamplifikacijos termociklerio ir paleiskite I-PCR programą.
Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
Jeigu tęsiate [Pirmosios hibridizacijos parengimas 58 psl.](#), laikykitės reagentų atšildymo nurodymų, pateiktų protokolo paruošimo etapuose.
9. Baigus I-PCR programą, 1 minutę centrifuguokite LS PCR plokštelę 280 × g.
10. Iš naujo pažymėkite plokštelę ALS (Amplifikuoti bibliotekos mėginiai).

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jeigu sustabdote tyrimą, ALS PCR plokštelę laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 30 dienų.

Pasiruošimas protokolo veiksmams

1. Įsitikinkite, kad nustatytos poamplifikacijos termociklerio programos. Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
2. Išimkite reagentų mėgintuvėlį iš dėžutės ir vykdykite atšildymo nurodymus.

Lentelė 24 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (laikyti šaldytuve) dėžutė (PN 20031123)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
TCB1	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Pirmosios hibridizacijos parengimas

Lentelė 25 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (užšaldytas) dėžutė (PN 20031121)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
TCA1	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Pirmosios hibridizacijos parengimas

Lentelė 26 „TruSight Oncology Comp Content Set“ dėžutė (PN 20031122)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
OPR1 (raudonas dangtelis)	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Pirmosios hibridizacijos parengimas
OPD2 (baltas dangtelis)	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Pirmosios hibridizacijos parengimas

Pirmosios hibridizacijos parengimas

Šio proceso metu dalis oligų hibridizuojama į kDNR bibliotekas, o dalis oligų hibridizuojama į gDNR bibliotekas, paruoštas per [PCR indeksavimas 56 psl.](#) Tikslinių sričių sodrinimui reikia dviejų hibridizacijos etapų. Pirmoje hibridizacijoje oligonukleotidai per naktį (nuo 8 iki 24 valandų) hibridizuojami į kDNR ir (arba) gDNR bibliotekas.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - TCB1 – 5 minutes šildykite mėgintuvėlį 37 °C temperatūroje. 10 s išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - TCA1 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - OPR1 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - OPD2 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
2. Jeigu ALS PCR plokštelė buvo sandėliuojama, atšildykite iki kambario temperatūros, tada 1 minutę centrifuguokite 280 × g. Pipetuodami sumaišykite.

3. Pažymėkite naują 96 šulinėlių PCR plokštelę HYB1 (1 hibridizacija).

Procedūra

1. Perkelkite po 20 µl kiekvienos kDNR ir (arba) gDNR bibliotekos iš ALS PCR plokštelės į atitinkamą HYB1 PCR plokštelės šulinėlį.
2. Užklijuokite lipnų sandariklį ant ALS PCR plokštelės ir padėkite į šalį.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
3. Patikrinkite, ar ant TCB1 nėra nuosėdų. Jeigu yra, dar kartą pašildykite mėgintuvėlį ir sukite jį, kol kristalai ištirps.
4. Į kiekvieną HYB1 PCR plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 15 µl TCB1.
5. Į kiekvieną HYB1 PCR plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 10 µl TCA1.
6. Pridėkite zondų.
Nenaudokite skirtingų tipų zondų kartu. Į šulinėlį dėkite tik vieną zondo rinkinį.
 - RNR bibliotekos šulinėliai – 5 µl OPR1 (raudonas dangtelis) kiekvienai bibliotekai, gautai iš RNR.
 - DNR „TSO Comprehensive (EU)“ bibliotekos šulinėliai – 5 µl OPD2 (baltas dangtelis) į kiekvieną iš DNR gautą biblioteką.
7. Užklijuokite lipnų sandariklį ant HYB1 PCR plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
8. 2 minutes purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
9. Padėkite ant termociklerio ir paleiskite HYB1 programą.
Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
10. Hibridizuokite 57 °C temperatūroje mažiausiai 8 valandas (iki 24 valandų).
11. Hibridizacijos reagentus grąžinkite į laikymo vietą.
12. ALS PCR plokštelę laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 30 dienų.

Pasiruošimas protokolo veiksmams

1. 2 dienos pradžioje išimkite reagento mėgintuvėlį iš dėžutės ir vykdykite atšildymo nurodymus.

Lentelė 27 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (laikyti šaldytuve) dėžutė (PN 20031123)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
SMB (tamsiai mėlyna etiketė)	2–8 °C	Palikite 30 minučių, kol pasieks kambario temperatūrą.	Pirmas taikinių fiksavimas Antras taikinių fiksavimas
ET2	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Pirmas taikinių fiksavimas Antras taikinių fiksavimas

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
HP3	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Pirmas taikinių fiksavimas Antras taikinių fiksavimas Bibliotekų normalizavimas
TCB1	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Antrosios hibridizacijos paruošimas
RSB	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Antras taikinių fiksavimas Pagerintos prisodrintos bibliotekos valymas

Lentelė 28 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (užšaldytas) dėžutė (PN 20031121)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
EE2	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Pirmas taikinių fiksavimas Antras taikinių fiksavimas Bibliotekų normalizavimas
EEW	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Pirmas taikinių fiksavimas
TCA1	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Antrosios hibridizacijos paruošimas

Lentelė 29 Tyrimas Turinio rinkinio dėžutė (PN 20031122)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
OPR1 (raudonas dangtelis)	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Antrosios hibridizacijos paruošimas
OPD2 (baltas dangtelis)	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Antrosios hibridizacijos paruošimas

Pirmas taikinių fiksavimas

Šiame etape naudojami SMB fiksuoti zondus, hibridizuotus į tikslines dominančias sritis. Granulės plaunamos tris kartus naudojant EEW. Prisodrintos bibliotekos yra eliuuojamos šviežiu „EE2 + HP3 Elution Mix“ ir neutralizuojamos naudojant ET2.

Paruošimas

- Įkaitinkite mikromėginių inkubatorių su MIDI šildymo bloko įdėklą iki 57 °C.
- Paruoškite toliau nurodytus reagentus.

- EEW – maišykite 1 minutę.
 - EE2 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - HP3 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - SMB – pasirūpinkite, kad granulės kambario temperatūroje pabūtų 30 minučių. Šiai procedūrai būtinai naudokite **SMB**, o ne SPB.
 - ET2 – atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.
3. Paruoškite šviežią „EE2 + HP3 Elution Mix“ mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje.

Lentelė 30 „EE2 + HP3 Elution Mix“, skirtas pirmam taikinių fiksavimui

„Elution Mix“ komponentas	4 bibliotekos	8 bibliotekos	16 bibliotekų	24 bibliotekos	48 bibliotekos
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Šioje lentelėje pateikiamas tūrio paviršius. Skaičiavimai pateikti skyriuje [Reagentų naudojimas 33 psl.](#)

4. „EE2 + HP3 Elution Mix“ išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Atidėkite [Eliutas 62 psl.](#) veiksmui.
5. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelę „CAP1“ (1 fiksavimas).
6. Nustatykite magnetą.

Procedūra

Surišimas

1. HYB1 PCR plokštelę išimkite iš termociklerio.
2. HYB1 PCR plokštelę 1 minutę centrifuguokite 280 × g.
3. SMB maišykite 1 minutę, kad vėl suspenduotumėte granules.
4. Nedelsdami į kiekvieną CAP1 MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 150 µl SMB.
Jei SMB išpilti naudojate lovelį, skaičiuodami alikvotinę dalį įskaičiuokite 1,15 pirmojo koeficientą, kad vienam mėginiui pakaktų medžiagos.
Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpylę SMB, visas likusias medžiagas išmeskite.
5. Nustatykite pipetę ties 50 µl ir visą tūrį iš kiekvienos bibliotekos HYB1 PCR plokštelėje perpilkite į atitinkamą CAP1 MIDI plokštelės šulinėlį.
6. Išmeskite tuščią HYB1 PCR plokštelę.
7. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CAP1 MIDI plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
8. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
9. 25 minutes inkubuokite iš anksto pašildytame mikromėginių inkubatoriuje 57 °C temperatūroje.
10. Padėkite CAP1 MIDI plokštelę ant magnetinio stovo 2 minutėms.

11. Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno šulinėlio, nesutrikdydami granulių sandaupos.



DĖMESIO!

Nedelsdami pereikite prie kito veiksmo (*Plovimas 62 psl.*). Neleiskite granulių sandaupai ilgai likti be skysčio.

Plovimas

1. Nuplaukite granules taip, kaip nurodyta toliau.
 - a. Išimkite CAP1 MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
 - b. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 200 µl EEW.
 - c. Naudokite 150 µl pipetę ir pipetuokite mažiausiai 10 kartų, kad sumaišytumėte. Įsitikinkite, jog visos granulės yra suspenduotos iš naujo.

Atsargiai įsiurbdami visą granulių tirpalą į antgalį įsitikinkite, kad jame nėra granulių sandaupos. Vizualiai apžiūrėkite kiekvieno šulinėlio dugną. Jei yra granulių sandaupa, plovimo metu pakreipkite pipetės antgalį link granulių, kad jos išsisklaidytų. Įsitikinkite, kad visa granulių sandaupa visiškai panardinta tirpale. Tirpalas turėtų atrodyti tamsiai rudas ir būti vienalytės konsistencijos.
 - d. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CAP1 MIDI plokštelės.
 - e. Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
 - f. 4 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
 - g. 5 minutes inkubuokite mikromėginių inkubatoriuje 57 °C temperatūroje.
 - h. Padėkite CAP1 MIDI plokštelę ant magnetinio stovo 2 minutėms.
 - i. Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno šulinėlio, nesutrikdydami granulių sandaupos.
2. **Antrą** kartą plaukite granules.
3. Išplaukite granules **trečią** kartą.
4. Pipete su smulkiais antgaliais pašalinkite etanolio likučius iš kiekvieno šulinėlio.

Eliutas

1. Išimkite CAP1 MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
2. Šviežią „EE2 + HP3 Elution Mix“ išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
3. Į kiekvieną CAP1 MIDI plokštelės šulinėlį atsargiai įpilkite 17 µl „EE2 + HP3 Elution Mix“.
4. Išmeskite likusį „EE2 + HP3 Elution Mix“.
5. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CAP1 MIDI plokštelės.

Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
6. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.

7. Padėkite ant magnetinio stovo 2 minutėms.
8. Pažymėkite naują 96 šulinėlių PCR plokštelę ELU1 (1 eliuavimas).
9. Išmaišykite ET2 sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
10. Į kiekvieną atitinkamą bibliotekos šulinėlį naujojoje ELU1 PCR plokštelėje įpilkite 5 µl ET2.
11. 15 µl eliuato iš kiekvieno CAP1 MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlio atsargiai perpilkite į atitinkamą ELU1 PCR plokštelės šulinėlį.
12. Išmeskite tuščią CAP1 MIDI plokštelę.
13. Užklijuokite lipnų sandariklį ant ELU1 PCR plokštelės.
14. Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
15. 2 minutes purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
16. Grąžinkite EEW į laikymo vietą.

Antrosios hibridizacijos paruošimas

Šis žingsnis antrą kartą susieja prisodrintų kDNR ir (arba) gDNR bibliotekų tikslines sritis su fiksavimo zondais. Antroji hibridizacija užtikrina didelį užfiksuotų sričių specifiškumą. Siekiant užtikrinti optimalų bibliotekų prisodrinimą, antrąją hibridizacijos žingsnį atlikite 57 °C temperatūroje mažiausiai 1,5 valandos iki ne daugiau kaip 4 valandų.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - TCB1 – 5 minutes šildykite mėgintuvėlį 37 °C temperatūroje. 10 s išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - TCA1 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - OPR1 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - OPD2 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.

Procedūra

1. Patikrinkite, ar ant TCB1 nėra nuosėdų. Jeigu yra, dar kartą pašildykite ir sukite jį, kol kristalai ištirps.
2. Į kiekvieną ELU1 PCR plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 15 µl TCB1.
3. Į kiekvieną bibliotekos šulinėlį įpilkite 10 µl TCA1.
4. Pridėkite zondų.

Nenaudokite skirtingų tipų zondų kartu.

 - RNR bibliotekos šulinėliai – 5 µl OPR1 (raudonas dangtelis) kiekvienai bibliotekai, gautai iš RNR.
 - DNR „TSO Comprehensive (EU)“ bibliotekos šulinėliai – 5 µl OPD2 (baltas dangtelis) į kiekvieną iš DNR gautą biblioteką.
5. Užklijuokite lipnų sandariklį ant ELU1 PCR plokštelės.

Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.

6. 2 minutes purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
7. Padėkite ant termociklerio ir paleiskite HYB2 programą.
Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
8. Hibridizuokite 57 °C temperatūroje mažiausiai 1,5 valandos (iki 4 valandų).
9. Hibridizacijos reagentus grąžinkite į laikymo vietą.

Antras taikinių fiksavimas

Šiame etape naudojami SMB fiksuoti zondus, hibridizuotus į tikslines dominančias sritis. Granulės vieną kartą plaunamos su RSB. Prisodrintos bibliotekos yra eliuuojamos šviežiu „EE2 + HP3 Elution Mix“ ir neutralizuojamos naudojant ET2.

Paruošimas

1. Įkaitinkite mikromėginių inkubatorių su MIDI šildymo bloko įdėklą iki 57 °C.
2. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - EE2 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - HP3 – išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - SMB – pasirūpinkite, kad granulės kambario temperatūroje pabūtų 30 minučių.
Šiai procedūrai būtinai naudokite **SMB**, o ne SPB.
 - RSB – atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.
 - ET2 – atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.
3. Paruoškite šviežią „EE2 + HP3 Elution Mix“ mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje.

Lentelė 31 „EE2 + HP3 Elution Mix“, skirtas antram taikinių fiksavimui

„Elution Mix“ komponentas	4 bibliotekos	8 bibliotekos	16 bibliotekų	24 bibliotekos	48 bibliotekos
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Šioje lentelėje pateikiamas tūrio paviršius. Skaičiavimai pateikti skyriuje [Reagentų naudojimas 33 psl.](#)

4. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Atidėkite [Eliutas 66 psl.](#) veiksmui.
5. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelės CAP2 (2 fiksavimas).
6. Nustatykite magnetą.

Procedūra

Surišimas

1. ELU1 PCR plokštelę išimkite iš termociklerio.
2. ELU1 PCR plokštelę 1 minutę centrifuguokite 280 × g.
3. SMB maišykite 1 minutę, kad vėl suspenduotumėte granules.
4. Nedelsdami į kiekvieną CAP2 MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 150 µl SMB.
Jei SMB išpilti naudojate lovelį, skaičiuodami alikvotinę dalį įskaičiuokite 1,15 perviršio koeficientą, kad vienam mėginiui pakaktų medžiagos.
Į kiekvieną mėginio šulinėlį įpylę SMB, visas likusias medžiagas išmeskite.
5. Nustatykite pipetę ties 50 µl ir visą turinį iš kiekvienos bibliotekos ELU1 PCR plokštelėje perpilkite į atitinkamą CAP2 MIDI plokštelės šulinėlį.
6. Išmeskite tuščią ELU1 PCR plokštelę.
7. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CAP2 MIDI plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
8. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
9. 25 minutes inkubuokite mikromėginių inkubatoriuje 57 °C temperatūroje.
Jeigu tęsiate [Sustiprinti prisodrintą biblioteką 67 psl.](#), vadovaukitės nurodymais dėl reagentų, pateiktais skyriuje „Pasirengimas protokolo veiksmams“.
10. Padėkite ant magnetinio stovo 2 minutėms.
11. CAP2 MIDI plokštelę palikite ant magnetinio stovo. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno šulinėlio, nesutrikdydami granulių sankaupos.



DĖMESIO!

Nedelsdami pereikite prie kito veiksmo ([Plovimas 65 psl.](#)). Neleiskite granulių sankaupai ilgai likti be skysčio.

Plovimas

1. Išimkite CAP2 MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
2. Apverskite arba išmaišykite RSB sūkuriniu maišytuvu.
3. Į kiekvieną šulinėlį įpilkite 200 µl RSB.
4. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CAP2 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
5. 4 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
6. Plokštelę padėkite ant magnetinio stovo 2 minutėms.

7. Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno šulinėlio, nesutrikdydami granulių sandaupos.
8. Pipete su smulkiais antgaliais pašalinkite etanolio likučius iš kiekvieno šulinėlio.

Eliutas

1. Išimkite CAP2 MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
2. Šviežią „EE2 + HP3 Elution Mix“ išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
3. Į kiekvieną CAP2 MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 22 µl „EE2 + HP3 Elution Mix“.
4. Išmeskite likusį „EE2 + HP3 Elution Mix“.
5. Užklijuokite lipnų sandariklį ant CAP2 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
6. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
7. Padėkite ant magnetinio stovo 2 minutėms.
8. Pažymėkite naują 96 šulinėlių PCR plokštelę ELU2 (2 eliuavimas).
9. Išmaišykite ET2 sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
10. Į kiekvieną atitinkamą bibliotekos šulinėlį naujojoje ELU2 PCR plokštelėje įpilkite 5 µl ET2.
11. 20 µl eliuato iš kiekvieno CAP2 MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlio atsargiai perpilkite į atitinkamą ELU2 PCR plokštelės šulinėlį.
12. Išmeskite tuščią CAP2 MIDI plokštelę.
13. Užklijuokite lipnų sandariklį ant ELU2 PCR plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
14. 2 minutes purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
15. Grąžinkite SMB, EE2, HP3 ir ET2 į laikymo vietą.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jeigu sustabdote tyrimą, 1 minutę centrifuguokite ELU2 PCR plokštelę 280 × g ir laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 7 dienų. RSB padėkite atgal į laikymo vietą.

Pasiruošimas protokolo veiksmams

1. Paruoškite ledo kibirą arba jo ekvivalentą.
2. Išimkite reagentų mėgintuvėlį iš dėžutės ir vykdykite atšildymo nurodymus.

Lentelė 32 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (užšaldytas) dėžutė (PN 20031121)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
PPC3	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Sustiprinti prisodrintą biblioteką

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
EPM	Nuo -25 iki -15 °C	Laikykite šaltai.	Sustiprinti prisodrintą biblioteką

Lentelė 33 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (laikyti šaldytuve) dėžutė (PN 20031123)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
SPB (šviesiai žalia etiketė)	2–8 °C	Palikite 30 minučių, kol pasieks kambario temperatūrą.	Pagerintos prisodrintos bibliotekos valymas
RSB	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Pagerintos prisodrintos bibliotekos valymas Paruošimas sekvenavimui

Sustiprinti prisodrintą biblioteką

Šiame etape pradmenys naudojami prisodrintoms bibliotekoms amplifikuoti.

Paruošimas

1. Jeigu ELU2 plokštelė buvo sandėliuojama, atšildykite iki kambario temperatūros, tada 1 minutę centrifuguokite 280 × g.

Procedūra

1. PPC3 išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
2. Į kiekvieną ELU2 PCR plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 5 µl PPC3.
3. EPM pamaišykite 5 sekundes, tada trumpai centrifuguokite.
4. Į kiekvieną bibliotekos šulinėlį įpilkite 20 µl EPM.
5. Užklijuokite lipnų sandariklį ant ELU2 PCR plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
6. 2 minutes purtykite 1 200 aps./min. greičiu.
7. Padėkite ant termociklerio ir paleiskite EL-PCR programą.
Žr. [Programų šiluminiai ciklai 42 psl.](#)
Jeigu tęsiate [Bibliotekų normalizavimas 70 psl.](#), vadovaukitės atšildymo nurodymais, pateiktais skyriuje „Pasirengimas protokolo veiksmams“.
8. PPC3 ir EPM grąžinkite į laikymo vietą.

Pagerintos prisodrintos bibliotekos valymas

Šiame etape SPB naudojamas nepageidaujamų reakcijų komponentams išvalyti iš prisodrintų bibliotekų. Granulės du kartus plaunamos šviežiu 80 % etanolio. Bibliotekos yra eliuuojamos naudojant RSB.

Paruošimas

1. Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - SPB – įsitikinkite, kad granulės kambario temperatūroje pabus 30 minučių. Šiai procedūrai būtinai naudokite **SPB**, o ne SMB.
 - RSB – atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.
2. Paruoškite šviežio 80 % etanolio 15 ml arba 50 ml kūginiame mėgintuvėlyje.

Lentelė 34 Paruoškite šviežio 80 % etanolio

Reagentas	4 bibliotekos	8 bibliotekos	16 bibliotekų	24 bibliotekos	48 bibliotekos
100 % etanolis, grynas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
„RNase/DNase-free water“	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Šviežią 80 % etanolį sumaišykite centrifuguodami.
4. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelę BIND2 (surišimo išvalymas).
5. Nustatykite magnetą.

Procedūra

Surišimas

1. ELU2 PCR plokštelę išimkite iš termociklerio.
2. ELU2 PCR plokštelę 1 minutę centrifuguokite 280 × g.
3. SPB maišykite 1 minutę, kad vėl suspenduotumėte granules.
4. Nedelsdami į kiekvieną BIND2 MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 110 µl SPB.
5. 50 µl iš kiekvieno ELU2 PCR plokštelės šulinėlio perpilkite į atitinkamą BIND2 MIDI plokštelės šulinėlį.
6. Išmeskite tuščią ELU2 PCR plokštelę.
7. Užklijuokite lipnų sandariklį ant BIND2 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
8. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
9. Inkubuokite 5 min. kambario temperatūroje.
10. Padėkite BIND2 MIDI plokštelę ant magnetinio stovo 5 minutėms.
11. Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno šulinėlio, nesutrikdydami granulių sankaupos.

Plovimas

1. Nuplaukite granules taip, kaip nurodyta toliau.
 - a. Palaikykite BIND2 MIDI plokštelę ant magnetinio stovo ir į kiekvieną šulinėlį įpilkite po 200 µl šviežio 80 % etanolio.
 - b. Palaikykite 30 sekundžių.
 - c. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno šulinėlio, nesutrikdydami granulių sankaupos.
2. Antrą kartą plaukite granules.
3. Pipete su smulkiais antgaliais pašalinkite etanolio likučius iš kiekvieno šulinėlio.
4. Išpilkite nepanaudotą 80 % etanolį.

Eliutas

1. Išimkite BIND2 MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
2. Apverskite arba sukite, kad sumaišytumėte RSB.
3. Į kiekvieną bibliotekos šulinėlį įpilkite 32 µl RSB.
4. Užklijuokite lipnų sandariklį ant BIND2 MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
5. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
6. Inkubuokite 2 min. kambario temperatūroje.
7. Padėkite ant magnetinio stovo 2 minutėms.
8. Pažymėkite naują 96 šulinėlių PCR plokštelę PL (išgrynintos bibliotekos).
9. 30 µl kiekvieno eliuato iš BIND2 MIDI plokštelės perpilkite į atitinkamą PL PCR plokštelės šulinėlį.
10. Išmeskite tuščią BIND2 MIDI plokštelę.
11. Užklijuokite lipnų sandariklį ant PL PCR plokštelės.
12. SPB padėkite atgal į laikymo vietą.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jeigu sustabdote tyrimą, 1 minutę centrifuguokite PL PCR plokštelę 280 × g ir laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 30 dienų. RSB padėkite atgal į laikymo vietą.

Pasiruošimas protokolo veiksmams

1. Išimkite reagentų mėgintuvėlį iš dėžutės ir vykdykite atšildymo nurodymus.

Lentelė 35 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (užšaldytas) dėžutė (PN 20031121)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
LNA1	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Bibliotekų normalizavimas
EE2	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje.	Bibliotekų normalizavimas

Lentelė 36 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (laikyti šaldytuve) dėžutė (PN 20031123)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
LNB1	2–8 °C	Palikite 30 minučių, kol pasieks kambario temperatūrą.	Bibliotekų normalizavimas
HP3	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Bibliotekų normalizavimas Paruošimas sekvenavimui
LNW1	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Bibliotekų normalizavimas
LNS1	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Bibliotekų normalizavimas

2. Jeigu tą pačią dieną tęsiate [Paruošimas sekvenavimui 74 psl.](#), vadovaukitės atšildymo nurodymais, pateiktais skyriuje „Pasirengimas protokolo veiksmams“.

Bibliotekų normalizavimas

Šio proceso metu naudojamas LNB1 ir priedai (LNA1), kad būtų normalizuotas kiekvienos bibliotekos kiekis ir užtikrintas vienodas bibliotekos atvaizdavimas jungtinėse bibliotekose. Granulės du kartus plaunamos naudojant LNW1, Bibliotekos yra eliuuojamos šviežiu „EE2 + HP3 Elution Mix“ ir neutralizuojamos naudojant LNS1.

Paruošimas

- Paruoškite toliau nurodytus reagentus.
 - LNB1 – pasirūpinkite, kad granulės kambario temperatūroje pabūtų 30 minučių.
 - LNA1 – išmaišykite sukuriniu maišytuvu.
 - EE2 – išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - HP3 – išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
 - LNW1 – išmaišykite sukuriniu maišytuvu. Atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.
 - LNS1 – išmaišykite sukuriniu maišytuvu. Atidėkite į šalį, kad galėtumėte naudoti procedūros metu.
- LNB1 maišykite 1 minutę, kad vėl suspenduotumėte granules.
Apverskite LNB1 mėgintuvėlį, kad įsitikintumėte, jog visos granulės yra suspenduotos iš naujo.
- Naudokite pipetę, nustatytą 800 µl, ir pipetuokite LNB1 10 kartų aukštyn ir žemyn, kad užtikrintumėte suspendavimą iš naujo.

4. Nedelsdami paruoškite šviežią „LNA1+LNB1 Master Mix“ kūginiame mėgintuvėlyje.



DĖMESIO!

Visiškai iš naujo suspenduokite LNB1 granulių sandėliuotą mėgintuvėlio apačioje, kad išvengtumėte nenuoseklaus klasterio tankio.

Lentelė 37 „LNA1 + LNB1 Master Mix“*

„Master Mix“ komponentas	4 bibliotekos	8 bibliotekos	16 bibliotekų	24 bibliotekos	48 bibliotekos
LNA1	305 µl	610 µl	1 219 µl	1 829 µl	3 658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Šioje lentelėje pateikiamas tūrio paviršius. Skaičiavimai pateikti skyriuje [Reagentų naudojimas 33 psl.](#)

5. Trumpai pamaišykite „LNA1+LNB1 Master Mix“. Atidėkite [Surišimas 71 psl.](#) veiksmui.
6. Paruoškite šviežią „EE2+HP3 Elution Mix“ mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje.

Lentelė 38 „EE2+HP3 Elution Mix“ bibliotekoms normalizuoti*

„Elution Mix“ komponentas	4 bibliotekos	8 bibliotekos	16 bibliotekų	24 bibliotekos	48 bibliotekos
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1 824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Šioje lentelėje pateikiamas tūrio paviršius. Skaičiavimai pateikti skyriuje [Reagentų naudojimas 33 psl.](#)

7. Šviežią eliuavimo mišinį išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite. Atidėkite [Eliutas 72 psl.](#) veiksmui.
8. Jeigu PL PCR plokštelė buvo sandėliuojama, atšildykite iki kambario temperatūros, tada 1 minutę centrifuguokite 280 × g. Pipetuodami sumaišykite.
9. Pažymėkite naują 96 šulinėlių MIDI plokštelę BBN (Normalizavimas granulėmis).
10. Nustatykite magnetą.

Procedūra

Surišimas

- Trumpai pamaišykite „LNA1+LNB1 Master Mix“.
- Nedelsdami įpilkite 45 µl „LNA1+LNB1 Master Mix“ į kiekvieną BBN MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlį.
- Išmeskite likusį „LNA1+LNB1 Master Mix“.
- 20 µl iš kiekvienos PL PCR plokštelės bibliotekos perpilkite į atitinkamą BBN MIDI plokštelės šulinėlį.
- Užklijuokite lipnų sandariklį ant BBN MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
- 30 minučių purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
- Uždėkite lipnų sandariklį ant PL PCR plokštelės ir grąžinkite į laikymo vietą.
- Padėkite BBN MIDI plokštelę ant magnetinio stovo 2 minutėms.

9. Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno šulinėlio, nesutrikdydami granulių sandaupos.

Plovimas

1. Nuplaukite granules taip, kaip nurodyta toliau.
 - a. Išimkite BBN MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
 - b. Į kiekvieną bibliotekos šulinėlį įpilkite 45 µl LNW1.
 - c. Užklijuokite lipnų sandariklį ant BBN MIDI plokštelės.
 - d. Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
 - e. 5 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
 - f. Padėkite BBN MIDI plokštelę ant magnetinio stovo 2 minutėms.
 - g. Plokštelę laikykite ant magnetinio stovo. Pipete, nustatyta ties 200 µl, išimkite ir išmeskite visus supernatantus iš kiekvieno šulinėlio, nesutrikdydami granulių sandaupos.
2. **Antrą** kartą plaukite granules.
3. Pipete su smulkiais antgaliais pašalinkite supernatanto likučius iš kiekvieno šulinėlio.

Eliutas

1. Išimkite BBN MIDI plokštelę iš magnetinio stovo.
2. Šviežią „EE2 + HP3 Elution Mix“ išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
3. Į kiekvieną BBN MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 32 µl EE2 + HP3 tirpalo.
4. Išmeskite likusį eliuavimo mišinį.
5. Užklijuokite lipnų sandariklį ant BBN MIDI plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
6. 2 minutes purtykite 1 800 aps./min. greičiu.
7. Padėkite ant magnetinio stovo 2 minutėms.
8. Pažymėkite naują 96 šulinėlių PCR plokštelę kaip NL (Normalizuotos bibliotekos).
9. 30 µl eliuato iš kiekvieno BBN MIDI plokštelės bibliotekos šulinėlio atsargiai perpilkite į atitinkamą NL PCR plokštelės šulinėlį.



DĖMESIO!

Jeigu granulės įsiurbiamos į pipetės antgalius, granules vėl paskleiskite ant plokštelės magnetiniame stove ir prieš pereidami prie kito procedūros veiksmo palaukite, kol skystis taps skaidrus (~2 minutes).

10. Išmeskite tuščią BBN MIDI plokštelę.
11. Sūkuriniu maišytuvu sumaišykite LNS1.
12. Į kiekvieną naujos NL PCR plokštelės bibliotekos šulinėlį įpilkite 30 µl NLS1.

13. Pipetuokite 5 kartus, kad sumaišytumėte.
14. Užklijuokite lipnų sandariklį ant NL PCR plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
15. Grąžinkite LNB1, LNA1, EE2, LNW1 ir LNS1 į laikymo vietą.

SAUGAUS SUSTOJIMO TAŠKAS

Jeigu sustabdote tyrimą, 1 minutę centrifuguokite NL PCR plokštelę 280 × g ir laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 30 dienų.

Pasiruošimas protokolo veiksmams

Ne mažiau kaip valandą prieš naudodami, pradėkite ruošti „NextSeq 550Dx“ „High Output Reagent Kit v2.5“ (300 ciklų) (PN 20028871) sekvenavimo vartojimo reikmenis.

1. Išimkite bibliotekos skiedimo buferį (HT1) iš saugyklos nuo -25 °C iki -15 °C. Atšildykite iki kambario temperatūros ir laikykite šaltai.
2. Laikykitės „NextSeq 550Dx Instrument“ informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513) kitų rinkinio eksploatacinių medžiagų paruošimo instrukcijų.
 - „NextSeq 550Dx“ „High Output Reagent Cartridge“ v2 (300 ciklų)
 - „NextSeq 550Dx“ „Buffer Cartridge“ v2 (300 ciklų)
 - „NextSeq 550Dx“ „High Output Flow Cell Cartridge“ v2.5 (300 ciklų)
3. Išimkite reagentų mėgintuvėlį iš dėžutės ir vykdykite atšildymo nurodymus.

Lentelė 39 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (užšaldytas) dėžutė (PN 20031121)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
„PhiX Internal Control“ (PX3 arba PhiX)	Nuo -25 iki -15 °C	Atšildykite kambario temperatūroje. Laikykite šaltai.	Paruošimas sekvenavimui

Lentelė 40 „TruSight Oncology Comp Enrichment“ (laikyti šaldytuve) dėžutė (PN 20031123)

Reagentas	Laikymas	Atšildymo nurodymai	Protokolo veiksmas
HP3	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Paruošimas sekvenavimui
RSB (rožinė etiketė)	2–8 °C	Pašildykite iki kambario temperatūros.	Paruošimas sekvenavimui

Paruošimas sekvenavimui

Paruošimas

1. Peržiūrėkite [Bibliotekų skaičius ir indeksų pasirinkimas 36 psl.](#)
2. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį dHP3 (atskiestas HP3).
3. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį dPhiX (atskiestas PhiX).
4. Įkaitinkite šildymo bloką iki 96 °C mikrocentrifugavimo mėgintuvėliams.
5. Paruoškite ledo kibirą arba jo ekvivalentą.

Praskieskite ir denatūruokite PhiX kontrolę

1. HP3 išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
2. Sumaišykite šiuos toliau nurodytus kiekius dHP3 mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl „RNase/DNase-free water“
3. dHP3 išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
4. Apverskite arba išmaišykite RSB sūkuriniu maišytuvu.
5. PhiX kontrolę išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
6. Sumaišykite toliau nurodytus kiekius dPhiX mikrocentrifugavimo mėgintuvėlyje.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX kontrolė
7. Į dPhiX mėgintuvėlį įpilkite 10 µl dHP3,
8. Išmeskite dHP3 mėgintuvėlį.
9. dPhiX mėgintuvėlį išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
10. Norėdami denatūruoti dPhiX inkubuokite 5 min. kambario temperatūroje.
11. HT1 sumaišykite sūkuriniu maišytuvu.
12. Nedelsdami įpilkite 980 µl iš anksto paruošto HT1 į dPhiX.
13. Išmaišykite sūkuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
14. Laikykite PhiX šaltai, kol jis bus naudojamas ruošiant antrąjį skiedimą.
Galutinė koncentracija yra 20 pM dPhiX.
15. Grąžinkite PhiX, HP3 ir RSB į laikymo vietą.

„TSO Comprehensive (EU)“ skirtas bibliotekų junginys ir denatūravimas

1. Jeigu NL PCR plokštelė buvo sandėliuojama, atšildykite iki kambario temperatūros, tada 1 minutę centrifuguokite plokštelę 280 × g.

2. Naudodami 30 µl daugiakanalę pipetę, atsargiai sumaišykite pipetuodami NL PCR plokštelės bibliotekas penkis kartus.

Naudokite naujus antgalius kiekvienai bibliotekai.



DĖMESIO!

Pasirūpinkite gerai sumaišyti bibliotekas, kad jos veiktų optimaliai.

3. Pasirinkite vieną iš šių variantų bibliotekoms sujungti, denatūruoti ir atskiesti.
 - **1 variantas:** Iš RNR mėginių ir DNR mėginių gautas bibliotekas sekvenuokite vienu metu. Žr. [1 variantas: DNR ir RNR bibliotekos kartu 75 psl.](#)
 - **2 variantas:** Sekvenuokite tik iš DNR mėginių gautas bibliotekas. Žr. [2 variantas: Tik DNR bibliotekos 76 psl.](#)
 - **3 variantas:** Sekvenuokite tik iš RNR mėginių gautas bibliotekas. Žr. [3 variantas: Tik RNR bibliotekos 77 psl.](#)

1 variantas: DNR ir RNR bibliotekos kartu

1. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį PRL (Jungtinės RNR bibliotekos).
2. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį PDL (Jungtinės DNR bibliotekos).
3. Perkelkite po 10 µl kiekvienos normalizuotos RNR (kDNR) bibliotekos iš NL plokštelės į PRL mėgintuvėlį. Negalima sujungti dviejų bibliotekų su tuo pačiu indekso pradmeniu.
4. Perkelkite po 10 µl kiekvieno normalizuotos DNR bibliotekos iš NL plokštelės į PDL mėgintuvėlį. Negalima sujungti dviejų bibliotekų su tuo pačiu indekso pradmeniu.
5. Užklijuokite lipnų sandariklį ant NL PCR plokštelės. Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
6. PRL ir PDL mėgintuvėlius išmaišykite sukuriniu maišytuvu.
7. Trumpai centrifuguokite PRL ir PDL mėgintuvėlius.
8. 2 minutes inkubuokite PRL ir PDL mėgintuvėlius 96 °C temperatūros šildymo bloke.
9. PRL ir PDL mėgintuvėlius 5 minutes laikykite šaltai.
10. PRL ir PDL mėgintuvėlius išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
11. PRL ir PDL mėgintuvėlius laikykite šaltai.

Paruoškite pirmąjį skiedimą

1. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį DIL1 (1 tirpalas).
2. Perpilkite 20 µl PDL į tuščią DIL1 mėgintuvėlį.
3. Į DIL1 įpilkite 5 µl PRL.
4. Išmeskite PDL ir PRL mėgintuvėlius.
5. Į DIL1 mėgintuvėlį įpilkite 475 µl iš anksto paruošto HT1 (atskiesta 1:20).

6. DIL1 mėgintuvėlį išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.

Paruoškite antrąjį skiedimą

1. Pažymėkite 2,0 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį DIL2 (2 tirpalas).
2. Perpilkite 40 µl DIL1 į tuščią DIL2 mėgintuvėlį.
3. Išmeskite DIL1 mėgintuvėlį.
4. Į DIL2 mėgintuvėlį įpilkite 1 660 µl iš anksto paruošto HT1 (atskiesta 1:850).
5. Paruoštą 20 pM dPhiX mėgintuvėlį išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
6. Į DIL2 mėgintuvėlį įpilkite 2,5 µl paruošto 20 pM dPhiX.
7. Išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
8. Įdėkite 1 300 µl DIL2 į atšildytą „NextSeq 550Dx“ „High Output Reagent Cartridge v2“ (300 ciklų)
Daugiau informacijos žr. „NextSeq 550Dx Instrument“ informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513).
9. Išmeskite DIL2 mėgintuvėlį.
10. Centrifuguokite NL PCR plokštelę 280 × g 1 minutę ir laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 30 dienų.
11. Pereikite prie sekvenavimo.
Daugiau informacijos žr. „NextSeq 550Dx Instrument“ informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513).

2 variantas: Tik DNR bibliotekos

1. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį užsukamuoju dangteliu PDL (Jungtinės DNR bibliotekos).
2. Perkelkite po 10 µl kiekvieno normalizuotos DNR bibliotekos iš NL plokštelės į PDL mėgintuvėlį.
Negalima sujungti dviejų bibliotekų su tuo pačiu indekso pradmeniu.
3. Užklijuokite lipnų sandariklį ant NL PCR plokštelės.
Visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
4. PDL mėgintuvėlį išmaišykite sukuriniu maišytuvu.
5. Trumpai centrifuguokite PDL mėgintuvėlį.
6. 2 minutes inkubuokite PDL mėgintuvėlį 96 °C temperatūros šildymo bloke.
7. PDL mėgintuvėlį 5 minutes laikykite šalta.
8. PDL mėgintuvėlį išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
9. PDL mėgintuvėlį laikykite šalta.

Paruoškite pirmąjį skiedimą

1. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį DIL1 (1 tirpalas).
2. Perpilkite 10 µl PDL į tuščią DIL1 mėgintuvėlį.
3. Išmeskite PDL mėgintuvėlį.
4. Į DIL1 mėgintuvėlį įpilkite 190 µl iš anksto paruošto HT1 (atskiesta 1:20).
5. DIL1 išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.

Paruoškite antrąjį skiedimą

1. Pažymėkite 2,0 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį DIL2 (2 tirpalas).
2. Perpilkite 40 µl DIL1 į tuščią DIL2 mėgintuvėlį.
3. Išmeskite DIL1 mėgintuvėlį.
4. Į DIL2 mėgintuvėlį įpilkite 1 660 µl iš anksto paruošto HT1 (atskiesta 1:850).
5. Paruoštą 20 pM dPhiX mėgintuvėlį išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
6. Į DIL2 mėgintuvėlį įpilkite 2,5 µl paruošto 20 pM dPhiX.
7. Išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
8. Įdėkite 1 300 µl DIL2 į atšildytą „NextSeq 550Dx“ „High Output Reagent Cartridge v2“ (300 ciklų).
Daugiau informacijos žr. „NextSeq 550Dx Instrument“ informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513).
9. Išmeskite DIL2 mėgintuvėlį.
10. Centrifuguokite NL PCR plokštelę 280 × g 1 minutę ir laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 30 dienų.
11. Pereikite prie sekvenavimo.
Daugiau informacijos žr. „NextSeq 550Dx Instrument“ informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513).

3 variantas: Tik RNR bibliotekos

1. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį PRL (Jungtinės RNR bibliotekos).
2. Perkelkite po 10 µl kiekvienos normalizuotos RNR (kDNR) bibliotekos iš NL plokštelės į PRL mėgintuvėlį.
Negalima sujungti dviejų bibliotekų su tuo pačiu indekso pradmeniu.
3. Užklijuokite lipnų sandariklį ant NL PCR plokštelės.
Kad neišgaruotų, visiškai užsandarinkite kraštus ir šulinėlius.
4. PRL mėgintuvėlį išmaišykite sukuriniu maišytuvu.
5. Trumpai centrifuguokite PRL mėgintuvėlį.
6. 2 minutes inkubuokite PRL mėgintuvėlį 96 °C temperatūros šildymo bloke.
7. PRL mėgintuvėlį 5 minutes laikykite šaltai.

8. PRL mėgintuvėlį išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
9. PRL mėgintuvėlį laikykite šaltai.

Paruoškite pirmąjį skiedimą

1. Pažymėkite mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį DIL1 (1 tirpalas).
2. Perpilkite 10 µl PRL į tuščią DIL1 mėgintuvėlį.
3. Išmeskite PRL mėgintuvėlį.
4. Į DIL1 mėgintuvėlį įpilkite 190 µl iš anksto paruošto HT1 (atskiesta 1:20).
5. DIL1 išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.

Paruoškite antrąjį skiedimą

1. Pažymėkite 2,0 ml mikrocentrifugavimo mėgintuvėlį DIL2 (2 tirpalas).
2. Perpilkite 40 µl DIL1 į tuščią DIL2 mėgintuvėlį.
3. Išmeskite DIL1 mėgintuvėlį.
4. Į DIL2 mėgintuvėlį įpilkite 1 646 µl iš anksto paruošto HT1 (atskiesta 1:843).
5. Paruoštą 20 pM dPhiX mėgintuvėlį išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
6. Į DIL2 mėgintuvėlį įpilkite 16,7 µl paruošto 20 pM dPhiX.
7. Išmaišykite sukuriniu maišytuvu, tada trumpai centrifuguokite.
8. Įdėkite 1 300 µl DIL2 į atšildytą „NextSeq 550Dx“ „High Output Reagent Cartridge v2“ (300 ciklą).
Daugiau informacijos žr. „NextSeq 550Dx Instrument“ informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513).
9. Išmeskite DIL2 mėgintuvėlį.
10. Centrifuguokite NL PCR plokštelę 280 × g 1 minutę ir laikykite nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje iki 30 dienų.
11. Pereikite prie sekvenavimo.
Daugiau informacijos žr. „NextSeq 550Dx Instrument“ informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513).

Rezultatų interpretavimas

„TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo sekvenavimo rezultatai pateikiami kiekvienam mėginiui atskirai, PDF ataskaitoje ir JSON ataskaitoje. Mažo gylio ataskaita (`LowDepthReport.tsv`) taip pat generuojama mėginio lygiu.

Serijos lygiu generuojami šie išvesties failai:

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

PDF ir JSON ataskaitose rodomi tik tie variantai, kurie pereina kokybės kontrolę.

Išsamią analizės informaciją žr. „*Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module*“ darbo eigos žinynas (dokumento Nr. 200008661).

Gretutinės diagnostikos rezultatai

Kiekvieno gretutinės diagnostikos (CDx) naudojimo atveju galimi trys rezultatai:

- **Teigiamas** — Aptiktas variantas arba biologinis žymuo, priskiriamas 1 lygiui (CDx).
- **Neaptikta** — Mėginyje neaptikta jokių variantų arba biologinių žymenų, susijusių su CDx numatyta paskirtimi. Mėginiui pasirinktas naviko tipas tinka CDx.
- **Nėra rezultato** — varianto būsenos nustatyti neįmanoma dėl vienos arba kelių iš šių priežasčių:
 - CDx paskirtis netaikoma tiriamam mėginiui, nes mėginiui parinktas naviko tipas neatitinka CDx naviko tipo.
 - Sekvenavimas neatitiko kokybės kontrolės specifikacijų.
 - Biblioteka neatitiko kokybės kontrolės specifikacijų.
 - Serijai naudota netinkama nukleorūgštis.

Visi CDx numatytosios paskirties rezultatai pateikiami JSON ataskaitos skyriuje „Gretutinės diagnostikos rezultatai“. PDF ataskaitos skyriuje „Gretutinės diagnostikos rezultatai“ yra išvardyti tik numatytosios paskirties būdai su teigiamu rezultatu.

Naviko profiliavimo variantai

„TSO Comprehensive (EU)“ yra skirtas pranešti apie somatinius variantus, kai pateikiami variantai, turintys klinikinės reikšmės požymių, arba variantai, galintys turėti klinikinę reikšmę. „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo programinė įranga naudoja KB, kuri nustato, ar kiekvienas aptiktas ir tinkamas variantas ([Lentelė 2](#)) yra kliniškai reikšmingas arba galimai kliniškai reikšmingas, remiantis terapinių, diagnostinių arba prognostinių asociacijų įrodymais. KB taip pat atsižvelgia į tai, ar ištirto naviko tipo asociacijos yra nustatytos (ar ne). Jautrumo arba vėžio rizikos asociacijos neįtrauktos į KB. Dažni polimorfizmai pašalinami.

Naviko profiliavimo variantuose teigiami rezultatai skirstomi į genominius rezultatus su klinikinės reikšmės įrodymais (2 lygis) arba genominius rezultatus, galinčius turėti klinikinę reikšmę (3 lygis) pagal įdiegtą KB ir nustatytą naviko tipą.

Dėl kokybės kontrolės trikčių negalima gauti rezultatų, susijusių su negauta kokybės kontrolės metrika. Daugiau informacijos žr. [Lentelė 41](#) ir [Lentelė 42](#). Naviko profiliavimo padėtys, kurių gylis nepakankamas, išvardytos Mažo gylio ataskaitoje, o ne „TSO Comprehensive (EU)“ ataskaitoje.

Kokybės kontrolė

- Informacijos apie nukleorūgšties kiekybinį nustatymą ir minimalaus įdedamo medžiagos kiekio reikalavimus žr. [Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl.](#)
- Sekvenavimo serija ir mėginio validumas nustatomas automatiškai ir apie jį praneša „TSO Comprehensive (EU)“ analizės modulis. Išsamią analizės informaciją žr. „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module“ darbo eigos žinynas (dokumento Nr. 200008661).
- „TSO Comprehensive (EU)“ ataskaitoje, kuri pateikiama PDF ir JSON formatais, apibendrinami kokybės kontrolės rezultatai. Ataskaitos failai yra analizės aplanke. Analizės aplanko (su PDF ir JSON ataskaitomis) ir serijų aplanko vieta nurodyta „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module“ darbo eigos žinynas (dokumento Nr. 200008661).

Lentelė 41 „TSO Comprehensive (EU)“ ataskaitos rezultatų KK metrika

Rezultato tipas	Metrika	Specifikacija	Aprašymas	Specifikacijos trikties poveikis*
Sekvenavimo serija	PCT_PF_READS (%)	≥80,0	Pro filtrą perėjusių nuskaitymų procentinė dalis (PF).	Sekvenavimo serija pripažinta negaliojančia. Apie jokių tyrimo mėginius nepranešta.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥80,0	1 nuskaitymo bazių identifikavimų, kurio kokybės įvertis yra Q30 arba didesnis, vidutinė procentinė dalis.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥80,0	2 nuskaitymo bazių identifikavimų, kurio kokybės įvertis yra Q30 arba didesnis, vidutinė procentinė dalis.	

Rezultato tipas	Metrika	Specifikacija	Aprašymas	Specifikacijos trikties poveikis*
DNR bibliotekos	CONTAMINATION_SCORE	$\leq 3 \cdot 10^6$ ARBA $> 3 \cdot 10^6$ ir $P_VALUE \leq 0,049$	Metrika, įvertinant taršos tikimybę naudojant bendrų variantų VAF. Taršos įvertis yra pagrįstas SNP VAF paskirstymu. Taršos P vertė, naudojama labai pertvarkytiems genomams įvertinti, taikoma tik tada, kai taršos įvertis viršija viršutinę specifikacijos ribą.	DNR rezultatų nepranešama.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Fragmento ilgio mėginyje mediana.	Apie TMB arba mažų DNR variantų rezultatus nepranešama.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (skaičius)	≥ 150	Vidutinė egzonų fragmentų aprėptis visose egzonų bazėse.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Egzono bazių su 50X fragmentų aprėptimi procentinė dalis.	
	USABLE_MSI_SITES (skaičius)	≥ 40	MSI vietų, naudojamų MSI identifikavimui, skaičius (skaičius mikrosatelitų vietų su pakankamos aprėpties nuskaitymais, kad būtų galima nustatyti mikrosatelitų nestabilumą).	MSI rezultatų nepranešama.
	COVERAGE_MAD (skaičius)	$\leq 0,210$	Absoliučiąjį nuokrypių nuo kiekvienos CNV tikslinės srities normalizuoto skaičiaus medianos mediana.	Genų amplifikacijos rezultatų nepranešama.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (skaičius)	$\geq 1,0$	Vidutinis neapdorotų intervalų skaičius pagal CNV tikslą.	

Rezultato tipas	Metrika	Specifikacija	Aprašymas	Specifikacijos trikties poveikis*
RNR bibliotekos	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥80,0	Fragmento ilgio mėginyje mediana.	Suliejimų arba splaisingo variantų rezultatų nepranešama.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeficientas)	≤0,93	MEDIAN_CV_GENE_500X yra aprėpties tolygumo matas. Kiekvienam genui, turinčiam bent 500x aprėptį, apskaičiuojamas aprėpties koeficientas genų visumoje. Ši metrika yra šių verčių mediana. Didelė vertė rodo aukštą variacijos lygį ir nurodo bibliotekos paruošimo nesklandumą, pvz., mažą mėginio kiekį ir (arba) zondo ištraukimo triktis. Ši metrika apskaičiuojama naudojant visus nuskaitymus (įskaitant nuskaitymus, pažymėtus kaip dublikatai).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (skaičius)	≥9 000 000	Bendras skaičius nuskaitymų, kartografuojančių tikslines sritis. Ši metrika apskaičiuojama naudojant visus nuskaitymus (įskaitant nuskaitymus, pažymėtus kaip dublikatai).	

* Sėkmingi rezultatai žymimi „PASS“ (pavyko).

Lentelė 42 „TSO Comprehensive (EU)“ ataskaitos rezultatų kontrolės metrikos

Rezultato tipas	Metrika	Specifikacija	Specifikacijos trikties poveikis*
Teigiama kontrolė	DNR išorinė kontrolė	Aptikta 23 iš 24 nurodytų variantų	Remdamiesi kontrolinių mėginių rezultatais rankiniu būdu pažymėkite kaip negaliojančius paciento mėginius. Analizės modulio programinė įranga automatiškai
	RNR išorinė kontrolė	Aptikta 12 iš 13 nurodytų variantų	nepažymi kaip negaliojančių paciento mėginių pagal kontrolinių mėginių rezultatus.

Rezultato tipas	Metrika	Specifikacija	Specifikacijos trikties poveikis*
Nešabloninė kontrolinė medžiaga	„TSO Comprehensive (EU)“ DNR egzono aprėpties mediana	≤8	Remdamiesi kontrolinių mėginių rezultatais rankiniu būdu pažymėkite kaip negaliojančius paciento mėginius. Analizės modulio programinė įranga automatiškai nepažymi kaip negaliojančių paciento mėginių pagal kontrolinių mėginių rezultatus.
	RNR genas virš medianos jautrumo ribos	≤1	

* Sėkmingi rezultatai žymimi „PASS“ (pavyko).

- Pakartokite negaliojančias sekvenavimo serijas.
- Pakartokite bibliotekų tyrimus su šiais rezultatais:
 - Užterštos DNR bibliotekos
 - Negaliojančios RNR bibliotekos
 - Ištyrimus galima pakartoti, norint gauti daugiau DNR bibliotekų variantų arba biologinių žymenų rezultatų, kurie buvo pripažinti negaliojančiais vienam, bet ne visiems variantų tipams.
- Teigiamos kontrolinės medžiagos vertinamos varianto identifikavimo atveju. Jeigu teigiamos kontrolės neatitinka varianto identifikavimo specifikacijų, rankiniu būdu pažymėkite sekvenavimo seriją kaip negaliojančią. Analizės modulio programinė įranga automatiškai nepažymi kaip negaliojančių paciento mėginių pagal kontrolinių mėginių rezultatus.
- DNR atveju NTC įvertinami pagal egzono aprėpties medianą, o RNR atveju – pagal genus, viršijančius jautrumo ribos medianą. Jeigu neigiamos kontrolės neatitinka specifikacijų, rankiniu būdu pažymėkite kaip negaliojančią bibliotekos paruošimo įvykį ir visas susijusias sekvenavimo serijas. Analizės modulio programinė įranga automatiškai nepažymi kaip negaliojančių paciento mėginių pagal kontrolinių mėginių rezultatus.
- Atlikite papildomas kokybės kontrolės priemones pagal vietos ir (arba) nacionalinius reglamentus arba akreditacijos reikalavimus.

Daugiau informacijos apie pakartotinius sekvenavimo tyrimus arba bibliotekų tyrimus žr. skyriuje [Trikčių šalinimas](#) 84 psl.

Trikčių šalinimas

Naudokitės šia lentele darbo eigos problemoms šalinti. Jei sekvenavimo serija arba bibliotekos paruošimas mėginiui nepavyksta du kartus, gali prireikti atlikti papildomą trikčių šalinimą. Kreipkitės į Illumina techninės priežiūros skyrių.

Stebėjimas	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
Sekvenavimo serija neatitinka serijos kokybės kontrolės specifikacijų.	- Telkimo klaida - Skiedimo klaida - Nevisiškas PRL/PDL šilumos denatūravimas - Problemos, susijusios su sekvenavimo eksploatacinių medžiagų paruošimu (pvz., nepakankamai atšildytos, kondensatas ir (arba) nešvarumai ant pratekamosios kiuvetės)	Pakartotinės bibliotekos iš normalizuotų bibliotekų (NL) PCR plokštelės. Žr. Paruošimas sekvenavimui 74 psl.
	- Netinkamas sodrinimo zondų naudojimas (pvz., OPR1 zondų, naudojamų DNR mėginiams, OPD2 zondų, naudojamų RNR mėginiams) - Klaida bibliotekos ruošimo darbo eigoje pirmojo hibridizacijos etapo metu arba po jo.	Iš naujo prisodrinkite bibliotekas iš amplifikuotų bibliotekų mėginių (ALS) PCR plokštelės. Žr. Pirmosios hibridizacijos parengimas 58 psl.
	Nepatenkinti mėginio įvesties reikalavimai	Bibliotekos parengimą pradėkite nuo darbo eigos pradžios. Žr. RNR denatūravimas ir aneliavimas 44 psl. arba Fragmento gDNR 49 psl.

Stebėjimas	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
Ataskaitos sukūrimo arba bendroji prietaiso paklaida (tinklo klaida, klaidos sudedant / išimant reagentus ir kt.)	Bibliotekos paruošimo darbo eigos klaida indekso PGR veiksmo metu arba prieš jį	Iš naujo prisodrinkite bibliotekas iš amplifikuotų bibliotekų mėginių (ALS) PCR plokštelės. Žr. Pirmosios hibridizacijos parengimas 58 psl.
	Prietaiso problema	Kreipkitės į Illumina techninės priežiūros skyrių.
	Programinės įrangos arba prietaiso problema.	Informacijos apie ataskaitų rengimą žr. „Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module“ darbo eigos žinynas (dokumento Nr. 200008661). Dėl papildomos pagalbos kreipkitės į Illumina techninės pagalbos tarnybą.
DNR biblioteka neatitinka kokybės kontrolės specifikacijų.	Nepatenkinti mėginio įvesties reikalavimai.	Įsitikinkite, kad mėginys įdėtas tinkamai, ir pakartokite bibliotekos paruošimą nuo gDNR fragmentavimo veiksmo. Žr. skyrių Mėginiui taikomi reikalavimai 26 psl. ir Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl.
	Tyrimo darbo eigoje naudojimo arba įrangos klaida.	Pakartokite bibliotekos paruošimą atlikdami vieną iš šių veiksmų, priklausomai nuo to, kur įvyko įtariamas naudojimas ar įrangos klaida. Jei nežinoma arba įvyko kitų klaidų, kreipkitės į Illumina techninės pagalbos tarnybą, kad pašalintumėte vykdymo klaidas. • Pakartotinės bibliotekos iš normalizuotų bibliotekų (NL) PCR plokštelės. Žr. Paruošimas sekvenavimui 74 psl. • Iš naujo prisodrinkite bibliotekas iš amplifikuotų bibliotekų mėginių (ALS) PCR plokštelės. Žr. Pirmosios hibridizacijos parengimas 58 psl. • Bibliotekos parengimą pradėkite nuo darbo eigos pradžios. Žr. Fragmento gDNR 49 psl.

Stebėjimas	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
DNR biblioteka neatitinka kokybės kontrolės specifikacijų (tęsinys).	Nesilaikoma CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE kriterijų.	Peržiūrėkite įspėjimus ir atsargumo priemones, kad sužinotumėte, kaip išvengti kryžminės taršos. Patikrinkite plokštelės išdėstymą ir bibliotekos indeksavimą, kad įsitikintumėte, jog to paties indekso bibliotekos nebuvo sujungtos. Atitinkamų bibliotekų parengimą pradėkite nuo darbo eigos pradžios. Žr. Fragmento gDNR 49 psl. Iškiriant mėginį jis galėjo būti užterštas. Gali prireikti pakartoti išskyrimą, užtikrinant, jog mėginys nebūtų užterštas.
	Naudojama MSI neveikė.	Peržiūrėkite ultragarso aparato gamintojo naudojimo ir veikimo nuostatas (įskaitant vandens lygį ir mėgintuvėlio tipą). Pasirūpinkite pateikti ištyrimui reikiamą kiekį mėginio. Žr. skyrių Mėginiui taikomi reikalavimai 26 psl. ir Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl. Jeigu mėginys yra per daug fragmentuotas arba pažeistas, gali prireikti išskirti naują mėginį ir (arba) pakartoti gDNR fragmentavimo veiksmą.
	Mėginys gali būti per daug fragmentuotas arba pažeistas nukleorūgšties, o tai turi poveikį galimybei sukurti pakankamai unikalių bibliotekų.	Peržiūrėkite Ultragarso garsiakalbio konfigūracijos nustatymai DNR suskaidymui 24 psl. ir ultragarso garsiakalbio gamintojo naudojimo ir veikimo nuostatas (įskaitant vandens lygį ir mėgintuvėlio tipą). Pasirūpinkite pateikti ištyrimui reikiamą kiekį mėginio. Žr. skyrių Mėginiui taikomi reikalavimai 26 psl. ir Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl. Jeigu mėginys yra per daug fragmentuotas arba pažeistas, gali prireikti išskirti naują mėginį ir (arba) pakartoti gDNR fragmentavimo veiksmą.

Stebėjimas	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
RNR biblioteka neatitinka kokybės kontrolės specifikacijų.	Nepatenkinti mėginio įvesties reikalavimai.	Įsitikinkite, kad mėginys įdėtas tinkamai, ir pakartokite bibliotekos paruošimą nuo RNR denatūravimo ir aneliavimo veiksmo. Žr. skyrių Mėginiui taikomi reikalavimai 26 psl. ir Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl.
RNR biblioteka neatitinka kokybės kontrolės specifikacijų.	Tyrimo darbo eigoje naudojimo arba įrangos klaida.	Pakartokite bibliotekos paruošimą atlikdami vieną iš šių veiksmų, priklausomai nuo to, kur įvyko įtariamas naudojimas ar įrangos klaida. Jei nežinoma arba įvyko kitų klaidų, kreipkitės į Illumina techninės pagalbos tarnybą, kad pašalintumėte vykdymo klaidas. • Pakartotinės bibliotekos iš normalizuotų bibliotekų (NL) PCR plokštelės. Žr. Paruošimas sekvenavimui 74 psl. • Iš naujo prisodrinkite bibliotekas iš amplifikuotų bibliotekų mėginių (ALS) PCR plokštelės. Žr. Pirmosios hibridizacijos parengimas 58 psl. • Bibliotekos parengimą pradėkite nuo darbo eigos pradžios. Žr. RNR denatūravimas ir aneliavimas 44 psl.
	Mėginys gali būti per daug fragmentuotas arba pažeistas nukleorūgšties, o tai turi poveikį galimybei sukurti pakankamai unikalių bibliotekų.	Įsitikinkite, kad mėginys įdėtas tinkamai. Žr. skyrių Mėginiui taikomi reikalavimai 26 psl. ir Nukleorūgšties išskyrimas, kiekybinis nustatymas ir sandėliavimas 26 psl. Jeigu mėginys yra per daug fragmentuotas arba pažeistas, gali prireikti išskirti naują mėginį.

Stebėjimas	Galima priežastis	Rekomenduojamas veiksmas
Teigiamos kontrolės triktis (DNR / RNR).	Teigiamos kontrolės mėginio įvesties reikalavimai nebuvo įvykdyti.	Pasirūpinkite pateikti ištyrimui reikiamą kiekį. Patikrinkite plokštelės išdėstymą ir įsitikinkite, kad atitinkamuose šulinėliuose yra atitinkami reagentai (zondai, indeksai). Įsitikinkite, kad teigiamos kontrolinės medžiagos mėginys buvo laikomas pagal etiketės reikalavimus. Dėl visų mėginių, kuriems naudojama teigiama kontrolinė medžiaga, pakartokite bibliotekos paruošimą atlikdami vieną iš šių veiksmų, priklausomai nuo to, kur įvyko įtariama naudojimo arba įrangos klaida. Jei nežinoma arba įvyko kitų klaidų, kreipkitės į Illumina techninės pagalbos tarnybą, kad pašalintumėte vykdymo klaidas. • Pakartotinės bibliotekos iš normalizuotų bibliotekų (NL) PCR plokštelės. Žr. Paruošimas sekvenavimui 74 psl. • Iš naujo prisodrinkite bibliotekas iš amplifikuotų bibliotekų mėginių (ALS) PCR plokštelės. Žr. Pirmosios hibridizacijos parengimas 58 psl. • Bibliotekos parengimą pradėkite nuo darbo eigos pradžios. Žr. RNR denatūravimas ir aneliavimas 44 psl. arba Fragmento gDNR 49 psl.
NTC triktis (DNR / RNR).	Įvyko kryžminė tarša arba darbo vietos užteršimas.	Peržiūrėkite skyrių „Ispėjimai ir atsargumo priemonės“, kuriame rasite informacijos apie darbo vietų nukenksminimą ir kryžminės taršos išvengimą. Patikrinkite plokštelės išdėstymą ir bibliotekos indeksavimą, kad įsitikintumėte, jog to paties indekso bibliotekos nebuvo sujungtos. Pakartokite bibliotekos paruošimą nuo darbo eigos pradžios visoms bibliotekoms, kurioms naudojama Nešabloninė kontrolinė medžiaga.
Programinė įranga rodo, kad į sekvenavimo seriją nebuvo įtrauktos teigiamos ir (arba) neigiamos kontrolės.	Klaidingas vėžio tipo identifikavimas atliekant „Local Run Manager“ serijos planavimą.	Pakartokite analizę, jeigu kontrolės tinkamai identifikuotos, kaip nurodyta Analizės modulio darbo eigos žinyne (žr. „<i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module</i>“ darbo eigos žinynas (dokumento Nr. 200008661)).

Veikimo charakteristikos

„TSO Comprehensive (EU)“ yra tikslinė NGS grupė su 517 genų. Maži DNR variantai – vieno nukleotido variantai (SNV), kelių nukleotidų variantai (MNV), intarpai ir iškritos – gali būti pranešami iš visų 517 genų. Genų amplifikacijos gali būti pranešamos iš MET ir ERBB2 genų. Suliejimai gali būti registruojami tik iš 23 genų. Splaisingo variantai gali būti pranešami iš MET ir EGFR genų. Kad būtų galima pranešti, variantai turi būti aptikti ir turėti įrodymų ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ KB ir būti tinkami pagal tirtą audinio tipą. Kad būtų pranešta, NTRK suliejimams reikalinga, kad suliejimo partneris būtų 5', o NTRK kinazės domenas būtų nepažeistas.

Mažų DNR variantų atveju buvo taikytas reprezentatyvus metodas tiksliniams genams validuoti grupėje, su duomenimis, atitinkančiais SNV, MNV, intarpus ir iškritas. Genų amplifikacijų, suliejimų ir splaisingo variantų atveju tyrimai buvo atlikti genų lygiu. TMB ir MSI buvo įvertinti, jeigu nurodyta. NTRK suliejimų CDx patvirtinimų atveju suliejimai FFPE mėginiuose buvo tiriami tyrimuose, sutelktuose į konkrečiam patvirtinimui skirtą veikimo charakteristiką (pvz., Aptikimo riba, vienos laboratorijos precizija, atkuriamumas, tikslumas ir klinikinis veiksmingumas).

[Lentelė 43](#) pateikiamos įvairių tyrimų metu apskaičiuotų metrikų apibrėžtys.

Lentelė 43 Metrikos apibrėžtys

Terminas	Apibrėžtis
Teigiama procentinė sutaptis (PPA)	Procentinė dalis teigiamų rezultatų, teisingai nustatytų iš visų teigiamų rezultatų, palyginti su ortogonalium metodu.
Neigiama procentinė sutaptis (NPA)	Procentinė dalis neigiamų rezultatų, teisingai nustatytų iš visų neigiamų rezultatų, palyginti su ortogonalium metodu.
Bendroji procentinė sutaptis (OPA)	Procentinė dalis teigiamų ir neigiamų rezultatų, teisingai nustatytų iš visų stebėjimų, palyginti su ortogonalium metodu.
Teigiama procentinė atitiktis (PPC)	Procentinė dalis teigiamų identifikavimų, teisingai nustatytų pagal bendrą teigiamų rezultatų skaičių, palyginti su kontrolės būkle, atliekant tiesioginį porinį palyginimą.
Neigiama procentinė atitiktis (NPC)	Procentinė dalis neigiamų identifikavimų, teisingai nustatytų pagal bendrą neigiamų rezultatų skaičių, palyginti su kontrolės būkle, atliekant tiesioginį porinį palyginimą.
Teigiamas procentinis identifikavimas (PPC)	Pagal tikslą teigiamo rezultato stebėjimų procentinė dalis tarp stebėjimų, kuriuose tikimasi teigiamo pagal tikslą rezultato.
Neigiamas procentinis identifikavimas (NPC)	Pagal tikslą neigiamo rezultato stebėjimų procentinė dalis tarp stebėjimų, kuriuose tikimasi neigiamo pagal tikslą rezultato.

Kryžminė tarša

Kryžminės taršos tyrimas atliktas siekiant įvertinti, ar klaidingai teigiami rezultatai buvo gauti dėl taršos tarp šulinėlių ruošiant mėginių biblioteką, ar dėl taršos tarp eilės sekvenavimo serijų. Ši analizė buvo atlikta mažiems DNR variantams (kurie taip pat turi įtakos TMB), suliejimams, genų amplifikacijoms ir MSI. Bibliotekos buvo paruoštos iš charakterizuotų mėginių šachmatiniu išdėstymu, pakaitomis keičiant mėginius, kad būtų galima įvertinti užterštumą tarp šulinėlių, ir pakaitomis keičiant indeksus, kad būtų galima įvertinti užterštumą tarp sekvenavimo serijų, kai sekvenuojama iš eilės tame pačiame „NextSeq 550Dx instrument“.

Kryžminės taršos tyrimas parodė, kad kiekviename mėginyje tiriant aptiktus variantus buvo nustatyta nulinė tarša, o klaidingai teigiamų rezultatų nenustatyta.

Dvi kokybės kontrolės metrikos (CONTAMINATION_SCORE ir P_VALUE) buvo sukurtos „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimui, kad būtų galima aptikti mėginio užteršimą DNR mėginiuose. Buvo įvertintas užterštumo aptikimo jautrumas. FFPE naviko DNR mėginiai buvo sumaišyti su įvairiais FFPE normalių DNR mėginių kiekiais, kad būtų sukurti specialiai užteršti mėginiai.

Iš viso buvo gauta 1112 taršos stebėjimų, o užteršimas buvo aptiktas 95 % (1054) stebėjimų. Aptikimo dažnis buvo padidintas iki 96 % (939/976), kai užterštumo procentas buvo nuo 10 % iki 90 % (masė/masė). Iš 37 stebėjimų nuo 10 % iki 90 % taršos, kai nebuvo aptiktas užteršimas, 12 neatitiko aprėpties specifikacijų, kad būtų galima identifikuoti mažus DNR variantus. Maža aprėptis trukdo aptikti taršą, tačiau apie mažus DNR variantus nepranešama, kad jie sumažintų bet kokį užteršimo poveikį. Penkiolika stebėjimų neatitiko genų amplifikacijos specifikacijos (vidutinių binių skaičiaus QC metrikos), kad būtų galima identifikuoti genų amplifikaciją. Šių mėginių genų amplifikacijos rezultatai nebus pateikti.

Tyrimas parodė, kad „TSO Comprehensive (EU)“ ištyrimo metu tikimasi mažos kryžminės taršos iš šulinėlio į šulinėlį arba iš serijos į seriją dažnio. Šie rezultatai kartu su programinės įrangos užteršimo metrika sumažina klaidingų variantų rezultatų dėl mėginio užteršimo riziką.

Nukleorūgšties išskyrimo rinkinio įvertinimas

Trys rinkoje esantys DNR ir RNR išskyrimo rinkiniai buvo įvertinti naudojant „TSO Comprehensive (EU)“. Trys išskyrimo rinkiniai išskyrė tiek DNR, tiek RNR iš tų pačių FFPE audinių segmentų. Rinkiniai skyrėsi deparafinizacijos medžiaga ir nukleorūgščių jungimo veiksmams ([Lentelė 44](#)). 1 rinkinys buvo dominuojantis išskyrimo rinkinys, naudojamas „TSO Comprehensive (EU)“ veiksmingumui nustatyti.

Lentelė 44 Rinkinio charakteristikos

Rinkinys	Deparafinizacijos agentas	Nukleorūgšties sujungimas
1	Patentuota	Stulpelis
2	Ksilenas	Stulpelis
3	Mineralinė alyva	Magnetinės granulės

[Lentelė 45](#) ir [Lentelė 46](#) apibendrinamas išskyrimo rinkinių poveikis bibliotekos validumui ir variantų identifikavimui. Apie skirtumą buvo pranešama, jei išskyrimo rinkinio vidurkiai reikšmingai skyrėsi. Vidutiniai išskyrimo rinkinių skirtumai buvo apskaičiuoti naudojant 1 rinkinį kaip kontrolę, nes 1 rinkinys buvo naudojamas

daugumai „TSO Comprehensive (EU)“ analitiniams tyrimams naudojamų nukleorūgščių ekstrahuoti. Buvo pranešta apie vidutinį skirtumą, palyginti su 1 rinkiniu, kad būtų parodyta, kaip skirtingi išskyrimo rinkiniai paveiktų kitus „TSO Comprehensive (EU)“ analitinius tyrimus.

Lentelė 45 Išskyrimo rinkinio poveikis bibliotekų validumui

Varianto tipas	Bibliotekos KK metrika	Vidutinis skirtumas, palyginti su 1 rinkiniu
Maži DNR variantai / TMB	Egzonų aprėpties mediana (skaičius)	2 rinkinys mažesnis 56 nuskaitymais
	PCT Exon50X (%)	3 rinkinys didesnis 0,298 %
	Įterpimo dydžio mediana (bp)	2 rinkinys mažesnis 3 bp
DNR MSI	Naudojamos MSI vietos	3 rinkinys didesnis 8 vietomis
DNR genų amplifikacija	MAD aprėptis (skaičius)	2 rinkinys mažesnis 0,0043
	Median Bin Count	2 rinkinys mažesnis 0,5825, 3 rinkinys didesnis 0,3086
RNR (Suliejimai / Splaisingo variantai)	Įterpimo dydžio mediana (bp)	3 rinkinys didesnis 2 bp
	Žurnalas (Median CV Gene500X)	2 rinkinys didesnis 0,029
	Iš viso tiksliniuose nuskaitymuose	Reikšmingų skirtumų nėra

Pastebėta, kad 2 ir 3 išskyrimo rinkiniai turi daugiau patvirtinamųjų nuskaitymų, todėl dėl išskyrimo rinkinių pasirinkimo didesnė tikimybė aptikti suliejimus ir splaisingo variantus netoli LoD.

Lentelė 46 Išskyrimo rinkinio poveikis variantų identifikavimui

Varianto tipas (vienetai)	Variantų priskyrimas (Vidutinis skirtumas, palyginti su 1 rinkiniu)
Maži DNR variantai (VAF)	Techniškai nereikšmingas Tiksliniai variantai: skirtumai tarp rinkinių buvo nedideli, palyginti su likutine dispersija Netiksliniai variantai: Pirmose dviejose VAF grupėse reikšmingų skirtumų nėra. Statistiškai reikšmingų skirtumų nepastebėta.
TMB (mutacija megabazėje)	Techniškai nereikšminga, dispersija tarp rinkinių buvo maža, palyginti su likutine dispersija
MSI (% nestabilios vietos)	3 rinkinys mažesnis 1,9 % nestabilių vietų
Genų amplifikacija (pokytis kartais)	2 rinkinys (0,06) ir 3 rinkinys (0,08) didesnis pokytis kartais
Suliejimai (patvirtinamieji nuskaitymai)	2 rinkinyje buvo 51 %, o 3 rinkinyje – 23 % daugiau patvirtinamųjų nuskaitymų
Splaisingo variantai (patvirtinamieji nuskaitymai)	2 rinkinyje ir 3 rinkinyje buvo 48 % daugiau patvirtinamųjų nuskaitymų

Trukdančiosios medžiagos

Buvo įvertintas galimų endogeninių ir egzogeninių medžiagų poveikis „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatams. Nukleorūgšties išskyrimo proceso metu į mėginius buvo įterptos endogeninės medžiagos (melaninas ir hemoglobinas). Nukleorūgšties išskyrimo proceso metu buvo egzogeninių medžiagų (etanolio, ksileno ir proteinazės K), kurios taip pat buvo įterptos į išgrynintą nukleorūgštį prieš paruošiant biblioteką. Kai buvo pastebėta trukdžių vartojant padidintą proteinazę K, taip pat buvo įvertinta padidėjusi proteinazės K koncentracija ekstrahavimo proceso metu. Medžiagos buvo pridėtos prie FFPE mėginių iš smegenų, krūties, storosios žarnos, plaučių, medulinės skydliaukės, NSLPV, kiaušidžių, prostatos, seilių, odos, minkštųjų audinių ir skydliaukės audinių – aštuoni mėginiai buvo ekstrahuoti DNR analizei ir 13 ekstrahuoti RNR analizei. Kiekvienam iš 16 unikalių mėginių buvo naudojama endogeninė kontrolė be smailių, o buferinė arba vandeninė egzogeninė kontrolė. Nekrozės poveikis buvo įvertintas naudojant kitą aštuonių FFPE mėginių rinkinį iš plaučių, smegenų ir gaubtinės žarnos audinių. Kiekviename nekrozės mėginyje nebuvo makrodisekcionuotos nekrozės kontrolės. Dėl visų trukdžių tyrimu „TSO Comprehensive (EU)“ buvo tiriami keturi kiekvienos medžiagos kartotiniai mėginiai ir palyginti su jų atitinkama kontrole, skirta aptikti mažus DNR variantus, genų amplifikacijas, RNR suliejimus ir RNR splaisingo variantus, taip pat MSI būsenai ir TMB įverčiui nustatyti. Buvo įtraukti ir CDx, ir naviko profilavimo variantai.

DNR variantų aptikimas

Melaninas (0,2 µg/ml), hemoglobinas (2 mg/ml), etanolis (5 %), proteinazė K (0,04 mg/ml nukleino rūgštyje) ir ksilenas (0,0001 %) netrukdo TMB įverčiui, MSI būsenai, mažiems DNR variantams ir genų amplifikacijai.

RNR variantų aptikimas

Duomenys neparodo jokių trukdžių kuriuos keltų melaninas (0,2 µg/ml), etanolis (5 %) ir ksilenas (0,0001 %) RNR suliejimams arba splaisingo variantams. Hemoglobinas (2 mg/ml) trukdė (sumažino patvirtinamuosius nuskaitymus) trims skirtingiems MET geno splaisingo variantams. AR geno (trys skirtingi mėginiai) ir vieno EGFR geno (vieno mėginio) spaisingo variantas nebuvo paveiktas. Jei laboratorijoje kartu su tyrimu atliekama RNR analizė, imant audinius iš audinių bloko reikia vengti hemoglobino arba jo kiekį sumažinti iki minimumo.

Proteinazė K (0,04 mg/ml nukleino rūgštyje) trukdė RNR suliejimui ir splaisingo variantams. Ekstrahavimo proceso metu buvo išbandyta 2,6 mg/ml ir 5,2 mg/ml proteinazės K koncentracija, t. y. 2 kartus ir 4 kartus didesnė už standartinę koncentraciją, esančią rinkoje parduodamame rinkinyje. Suliejimai buvo slopinami naudojant 4x, bet ne 2x proteinazę K. Splaisingo variantai buvo slopinami naudojant 2x proteinazę K.

Proteinazės K arba lygiavėrio fermento koncentracija ekstrahavimo metu neturėtų būti didinama lyginant su standartine koncentracija, pateikta išskyrimo rinkinyje.

Nekrozė

Iki 70 % nekrozinio audinio buvimas netrukdo TMB įverčiui, MSI būsenai, mažiems DNR variantams arba RNR splaisingo variantų aptikimui. RNR suliejimai (patvirtinamieji nuskaitymai) ir genų amplifikacija (pokytis kartais)

buvo sumažinti mėginiuose, kurių nekrotinis kiekis audinių srityje buvo $\geq 25\%$ (pagal plotą). Jei mėginio pjūviuose yra daugiau kaip 25% nekrozės nuo bendro audinio ploto, nekrozinis audinys turi būti makroskopiškai išpjautas.

Stabilumas

Stabilumas realiuoju laiku

Stabilumo realiuoju laiku rodiklis buvo naudojamas ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ rinkinio tinkamumo laikui nustatyti, kai jis laikomas pagal etiketėje nurodytas sąlygas. Tyrimo modelis buvo paremtas trijų reagentų partijų tyrimu ir taikytas klasikinis stabilumo tyrimo modelis, aprašytas CLSI EP25-A. Rinkiniai buvo laikomi galutinės komplektinės konfigūracijos visą tyrimo laikotarpį, gaminio etiketėje apibrėžtomis laikymo sąlygomis. Sušaldyti rinkinio komponentai buvo laikomi nuo -15°C iki -25°C temperatūroje. Atšaldyti rinkinio komponentai buvo laikomi nuo 2°C iki 8°C temperatūroje.

Nustatytais laiko momentais buvo tikrinama rinkinių išvaizda ir pagal funkcinius rinkinių išleidimo kriterijus. Be to, buvo analizuojamos KK kontrolinės medžiagos varianto identifikavimo ir mėginio kokybės kontrolės metrikos tendencijos. Buvo nustatyta kiekvieno reagento laikymo trukmė. Galiojimo laikas nustatomas atsižvelgiant į pagaminimo datą ir galiojimo laiką. Rinkinio galiojimo laikas priskiriamas pagal anksčiausiai pasibaigusį reagentą.

Rinkinio naudojimo stabilumas

Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ rinkinio stabilumas naudojant buvo įvertintas standartinėmis naudojimo sąlygomis per visą tinkamumo naudoti laikotarpį, kad būtų patvirtinta galimybė naudoti kelis rinkinius. Reagentų rinkinys buvo užšaldytas / atitirpdytas kelis kartus ir išbandytas, patvirtinant iki 4 rinkinio naudojimo kartų. Be to, 8 RNR ir 8 DNR bibliotekos buvo paruoštos iš viso 3 kartus, kad būtų ištirtas maksimalus palaikomų bibliotekų skaičius (24 DNR ir 24 RNR bibliotekos rinkinyje). Visų funkcinių rinkinių išleidimo kriterijų buvo laikomasi pagal visus užšaldymo / atšildymo ciklus ir tirtus laiko momentus. Buvo atlikti FFPE mėginių tyrimai su ≥ 25 mėnesių senumo reagentais, siekiant įvertinti naudojimo ciklo tyrimų poveikį variantų identifikavimui. Kokybinė tikslių variantų analizė rodo, kad naudojimo įvykiai neturėjo poveikio variantų identifikavimui.

Nukleino rūgšties stabilumas

Nukleino rūgščių (DNR ir RNR) stabilumas ir su juo susijęs kiekybinis įvertinimas, skirtas naudoti su „TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ („TSO Comprehensive (EU)“) tyrimu, buvo įvertintas naudojant FFPE mėginius iš kelių audinių tipų. FFPE blokai buvo suskaidyti ir visos nukleorūgštys buvo išskirtos iš karto. Išskirta nukleorūgštis buvo kruopščiai sumaišyta, kiekybiškai įvertinta, patikrinta dėl nukleorūgščių kokybės ir padalyta į du vienkartinio naudojimo mėgintuvėlių rinkinius, kurie bus užšaldyti dviem laiko momentams: T0 kontrolė (pradinis įvertinimas) ir T1 testas (≥ 28 dienos). Visa išskirta RNR buvo laikoma nuo -85°C iki -65°C temperatūroje, o visa išskirta DNR buvo laikoma nuo -25°C iki -15°C temperatūroje nurodytą laiką, o po to apdorojama per „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimą keliais pakartojimais ir operatoriais. T1 tyrimo būklė buvo palyginta su MSI būsenos kontrole, TMB balu, genų amplifikacijomis, mažais DNR variantais, RNR suliejimais ir

RNR splaisingo variantais. Duomenys rodo, kad nukleino rūgštys ir su jomis susiję kiekybiniai duomenys, skirti naudoti su „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimu, yra stabilūs iki 28 dienų, jei laikomi rekomenduojamoje temperatūroje (RNR nuo -85 °C iki -65 °C, o DNR nuo -25 °C iki -15 °C).

Bibliotekos stabilumas

Naudojant ištyrimą „TSO Comprehensive (EU)“ paruoštų bibliotekų stabilumas buvo įvertintas naudojant 8 FFPE DNR ir 8 FFPE RNR mėginius iš 9 skirtingų audinių tipų, ištyrimu tirtų trimis egzemplioriais. Bibliotekos iš normalizuotos bibliotekos (NL) PCR plokštelės buvo sujungtos ir sekvenuotos 0 dieną. Likęs NL PCR plokštelės bibliotekų kiekis buvo laikomas užšaldytas (nuo -25 °C iki -15 °C), tada pakartotinai sujungtas ir sekvenuotas 30 dieną. Bet kokie statistiškai reikšmingi mažų DNR variantų rezultatai nuo 0 iki 30 dienos buvo techniškai nereikšmingi. Nuo 0 iki 30 dienos MSI būsenos, TMB įvertinimo, genų amplifikacijos, RNR suliejimų ir RNR splaisingo variantų statistinių skirtumų nebuvo. Duomenys rodo, kad „TSO Comprehensive (EU)“ ištyrimu sukurtos bibliotekos nuo -25 °C iki -15 °C temperatūroje yra stabilios iki 30 dienų.

Skaidrėje esančio FFPE audinio stabilumas

Skaidrėje esančių FFPE audinių, skirtų naudoti su „TruSight Oncology Comprehensive (EU)“ („TSO Comprehensive (EU)“) tyrimu, stabilumas buvo įvertintas supjaustant FFPE blokus (5 µm sluoksniais) iš įvairių unikalių mėginių, įterpiant į skaidres, po to laikant kambario temperatūroje (22 °C) ir tikrinant 2 laiko momentus. RNR buvo ekstrahuota ir laikoma nuo -65 °C iki -85 °C temperatūroje, o DNR buvo ekstrahuota ir laikoma nuo -15 °C iki -25 °C temperatūroje mažiau nei 1 savaitę prieš tyrimą. Nukleino rūgščių medžiaga buvo kiekybiškai įvertinta ir apdorota „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimu per 24 valandas kiekvienu laiko momentu. Kiekvienu laiko momentu, naudojant „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimą, buvo ištirti keli pakartojimai ir operatoriai iš kiekvieno mėginio ir palyginti su T0 laiko momentu dėl MSI, TMB, genų amplifikacijų, mažų DNR variantų, RNR suliejimų ir RNR splaisingo variantų, įskaitant CDx ir naviko profiliavimo variantus. Variantų priskyrimas buvo įvertintas ir atitiko visus priimtino kriterijus, rodančius, kad skaidrėje esantys FFPE audiniai, skirti naudoti su „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimu, kambario temperatūroje išlieka stabilūs iki 4 savaičių (28 dienų). Pažymėtina, kad po 4 savaičių (28 dienų) MSI bibliotekos kokybės kontrolės galiojimo rodiklis sumažėjo 10 % dėl operatoriaus ir saugojimo laiko derinio, RNR sintezės ir plyšių palaikymo rodmenys po laikymo skaidrėje 4 savaites (28 dienas) sumažėjo maždaug 25 %.

Nukleorūgšties įdedamo kiekio titravimo apsauginis intervalas

Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ nukleorūgšties įdedamos kiekis buvo įvertintas tiriant DNR iš 33 FFPE mėginių, apimančių 17 audinių tipų, kai įdedamo kiekio lygis buvo nuo 10 ng iki 500 ng, ir tiriant RNR iš 5 FFPE mėginių iš 5 audinių tipų, kai įdedamo kiekio lygis buvo nuo 10 ng iki 85 ng. Bibliotekos kokybės kontrolės metrika buvo įvertinta ir priklausė nuo mėginio. DNR rezultatai parodė, kad kai kurios, bet ne visos DNR mėginio KK metrikos reaguoja į padidėjusį įdedamą kiekį, viršijantį nominalų 40 ng kiekį:

- MEDIAN_INSERT_SIZE nereagavo į 30 ng viršijantį įdedamą kiekį.

- MEDIAN_EXON_COVERAGE parodė teigiamą koreliaciją su didėjančiu įdedamu kiekiu.
- PCT_EXON_50X padidėjo, padidinus įdedamą kiekį iki 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES padidėjo, padidinus įdedamą kiekį. Kai kurie mėginių, kurie, esant 40 ng, turėjo mažiau nei 40-imt USABLE_MSI_SITES, atitiko specifikaciją esant didesniems įdedamiems kiekiams, o tai suteikia galimybę apskaičiuoti MSI įvertį.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET padidėjo, padidinus įdedamą kiekį.
- Didinant įdedamą kiekį COVERAGE_MAD didėja link viršutinės specifikacijos riba.

RNR mėginio KK metrikos padidėjo (MEDIAN_INSERT_SIZE ir TOTAL_ON_TARGET_READS) arba sumažėjo (MEDIAN_CV_GENE_500X) esant 10 ng–40 ng įdedamam kiekiui, bet apskritai nesikeitė esant 40 ng–85 ng įdedamam kiekiui.

Tuščios vertės riba

Klaidingai teigiamų rezultatų procentinė dalis (iš visų tikėtinų neigiamų) buvo įvertinta kartotinai tiriant FFPE normalų arba gerybinį gretimą audinį, kuriame neturėtų būti somatinių mažų DNR variantų, genų amplifikacijų, MSI, RNR suliejimų ir RNR splaisingo variantų. Klaidingai teigiami TMB rezultatai nebuvo analizuojami, nes nėra klinikinės jautrumo ribos. Šeši DNR ir šeši RNR FFPE mėginiai buvo tiriami du kartus, 2 operatorių per 3 dienas, su kiekviena iš 2 reagentų partijų. Mėginių pogrupis buvo iš naujo sujungtas ir pakartotinai sekvenuotas tik 3x DNR ir tik 3x RNR formatu, siekiant įvertinti klaidingai teigiamus rezultatus, naudojant kelias multipleksavimo konfigūracijas, palaikomas šio prietaiso. Be to, buvo atlikta 30 papildomų RNR mėginių tyrimų dviem egzemplioriais, kurie buvo apdoroti naudojant 1 reagentų partiją, paskirsčius 2 operatoriams. Iš viso buvo atlikti 168 galimi DNR ir 228 RNR stebėjimai, atėmus kiekvieno varianto tipo negaliojančias bibliotekas. Klaidingai teigiamų rezultatų procentinė dalis buvo apskaičiuota amplifikacijos genų lygiu ir mažų DNR variantų padėties lygiu (maždaug 1,9 mln. padėčių). Klaidingai teigiamų DNR variantų tipų procentinė dalis pateikta [Lentelė 47](#). Klaidingai teigiamų RNR suliejimai ir splaisingo variantų procentinė dalis buvo 0 %, kaip parodyta [Lentelė 48](#).

Lentelė 47 Klaidingai teigiami rezultatai pagal DNR varianto tipą

Varianto tipas	Klaidingai teigiami rezultatai
Genų amplifikacija	0 % (0/9912)
Maži DNR variantai	0,0001 % (271/295 801 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Netaikoma*

* Klaidingai teigiami rezultatai netaikomi, nes TMB nurodomas kaip įvertis ir neturi kokybinio rezultato.

Lentelė 48 Klaidingai teigiami rezultatai pagal RNR varianto tipą

Varianto tipas	Klaidingai teigiami rezultatai
Suliejimas	0 % (0/226)
Splaisingo variantas	0 % (0/226)

Aptikimo riba

Siekiant įvertinti „TSO Comprehensive (EU)“ aptikimo ribas, buvo atlikti du tyrimai. 1 tyrime įvertinti RET maži DNR variantai, RET suliejimai ir NTRK1–3 suliejimai. 2 tyrime įvertinti kiti naviko profiliavimo variantai.

1 tyrimas

Buvo nustatytos NTRK1, NTRK3 ir RET mažų DNR variantų bei NTRK1–3 ir RET suliejimų aptikimo ribos (LoD). LoD yra mažiausia analizės vertė (pvz., varianto alelių dažnis arba patvirtinamieji nuskaitymai), kurią galima nuosekliai aptikti (95 % aptikimo riba arba II tipo paklaida – 5 %). Tyrime buvo naudojami FFPE audiniai su RET mažais DNR variantais (meduliarinis skydliaukės vėžys), RET suliejimai (papiliarinės skydliaukės karcinoma, atipinis špicoidinis navikas) ir NTRK1–3 suliejimai (žemo laipsnio glioma, multiforminė glioblastoma, miofibroblastinė sarkoma, sarkoma, sekrecinė krūties karcinoma, gaubtinės žarnos vėžys), taip pat FFPE apdorota ląstelių linija su NTRK1 ir NTRK3 mažais DNR variantais. Kiekvienas mėginys buvo atskiestas bent iki 5 tyrimo lygių (nuo maždaug 0,01 iki 0,10 VAF mažiems DNR variantams ir 2–25 suliejimų patvirtinamiesiems nuskaitymams). Buvo atlikta 18 kiekvieno tyrimo lygio kiekvienoje partijoje stebėjimų, kuriuos parengė 3 operatoriai, ir 3 sekvenavimo prietaisai, inicijuojantys bibliotekų paruošimą 3 dienas ne iš eilės su 2 kiekvieno mėginio testo lygio pakartojimais. Buvo ištirtos dvi reagentų partijos.

DNR variantams 2 partijos buvo analizuojamos nepriklausomai, naudojant probito regresiją arba pataikymų koeficiento metodą (žemiausias tyrimo lygis, kurio pataikymų koeficientas (taškinis įvertis) ≥ 95 %) nustatant kiekvieno varianto LoD pagal partiją. Didesnė LoD abiejose reagentų partijose buvo paimta kaip varianto aptikimo riba ([Lentelė 49](#)).

RNR suliejimų atveju FFPE ląstelių linijos buvo naudojamos kiekvieno suliejimo geno LoD vertėms nustatyti. Tada LoD buvo patikrintos su FFPE audiniais, naudojant du bibliotekų preparatus, 3 operatorius, 3 prietaisus ir 3 reagentų partijas, kad būtų gauti 54 stebėjimai vienam variantui greta LoD, nustatytos FFPE ląstelių linijomis. Kiekvienos suliejimo deklaruojamos aptikimo ribos ([Lentelė 50](#)) yra žemiausi vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai, kurie pasiekė ≥ 95 % pataikymo koeficientą (taškinį įvertį).

Lentelė 49 NTRK1, NTRK3 ir RET mažų DNR variantų aptikimo riba

Žymuo	Chromosoma	Padėtis	pamatinio	Alternatyva	Aptikimo riba (Variantų alelių dažnis)
NTRK1 G595R (SNV)*	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV)*	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV)*	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV)*	Chr15	88472468	C	G	0,027

Žymuo	Chromosoma	Padėtis	pamatinio	Alternatyva	Aptikimo riba (Varianto alelio dažnis)
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 (iškrita)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

Chr = chromosoma

* Šie DNR variantai buvo analizuojami probito regresija; kiti DNR variantai buvo analizuojami taikant pataikymų koeficiento metodą.

Lentelė 50 NTRK ir RET suliejimų aptikimo riba

Genas	Suliejimas	Aptikimo riba (patvirtinamieji nuskaitymai)
NTRK1	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6

2 tyrimas

Buvo įvertintos naviko „TSO Comprehensive (EU)“ praneštų profiliavimo variantų aptikimo ribos (LoD). LoD yra mažiausia analizės vertė (varianto alelių dažnis, pokytis kartais arba patvirtinamieji nuskaitymai), kurią galima nuosekliai aptikti (95 % pataikymo koeficientas arba II tipo paklaida – 5 %). FFPE mėginiai iš 17 audinių tipų, kuriuose yra variantų, buvo praskiesti iki kelių tyrimo lygių. Du operatoriai gavo šešis stebėjimus viename lygyje, naudodami skirtingą reagentų partiją ir prietaisą.

DNR variantai

10 mažų DNR variantų klasių LoD (iš viso 25 variantai) ir 2 DNR geno amplifikacijos (ERBB2 ir MET) buvo nustatytos ir apibendrintos kaip intervalai (Lentelė 51). Taip pat įtraukti 1 tyrimo LoD RET variantai. Dviejų intarpų iš 3, kurie buvo didesni kaip 5 bp, LoD buvo 0,034 ir 0,036 VAF, o trečiojo LoD buvo 0,215 VAF. Pastarasis buvo intarpas mažo sudėtingumo srityje, kur intarpas prideda papildomų pakartojimų, veikia sugretinimą ir reikalauja daugiau nuskaitymų, kad aptikimas būtų nuoseklus. Todėl kai kurie mažo sudėtingumo genominiai kontekstai gali turėti įtakos > 5 bp intarpų aptikimui.

Lentelė 51 Mažų DNR variantų ir genų amplifikacijos aptikimo riba

Tipas (LoD matavimo vienetas)	Įvairios klasės / genominis kontekstas	Variantų skaičius	Intervalas
Maži DNR variantai (kintantis alelių dažnis)	SNVs	5	0,016–0,064
	MNV	3	0,022–0,048
	Intarpas (1–2 bp) prie homopolimero kartoja	2	0,086–0,104
	Intarpas (1–2 bp) šalia dinukleotido kartoja	2	0,038–0,051
	Intarpas (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Intarpas (> 5 bp ir iki 25 bp)	3	0,034–0,215
	Iškrita (1–2 bp) šalia homopolimero kartoja	2	0,094–0,100
	Iškrita (1–2 bp) šalia dinukleotido kartoja	2	0,033–0,070
	Iškrita (3–5 bp)	2	0,028–0,064
	Iškrita (> 5 ir iki 25 bp)	2	0,047–0,055
Genų amplifikacija (pokytis kartais)	Pagal geną (ERBB2, MET)	2	2,034–2,195

Suliejimai

LoD buvo nustatytos 18 suliejimo atvejų, sudarančių 20 genų „TSO Comprehensive (EU)“ grupėje, kurie svyravo nuo 10 iki 54,7 patvirtinamųjų nuskaitymų (Lentelė 52). Kitame tyrime buvo tiriami papildomi 3 genai (NTRK1 – 3). RET genas buvo ištirtas čia ir kitame LoD tyrime. Šešiolicos suliejimų su nustatyta LoD duomenys atitiko bendrą 16 patvirtinamųjų nuskaitymų LoD, naudojant dvipusę, 95 % viršutinę pasiklivimo ribą (UCL). Dviejų suliejimų LoD buvo 24,7 ir 44,2 patvirtinamųjų nuskaitymų, kurie neatitiko bendros LoD.

Suliejimo FGFR2-SRPK2, kurio LoD vertė buvo 24,7 patvirtinamųjų nuskaitymų, lūžio taške buvo kartotinių persidengiančių sričių, kaip nurodė tyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ programinė įranga. Kartotinės lūžio taško sritys paprastai pasižymi mažesniais įrodymo lygiais, nes nuskaitymai gali būti išdėstomi kitoje genomo vietoje

arba gali likti sugretinti. Be to, dėl pasikartojančių sričių surinkimo procesas (naudojamas suliejimo sekoms nustatyti) tampa sudėtingesnis ir reikia papildomų įrodymų, kad būtų galima sukurti teisingą seką. SEPT14-EGFR yra dar vienas suliejimo su homologine seka lūžio taške pavyzdys.

BCL2-IGHJ5 suliejimas, kurio LoD vertė yra 44,2 patvirtinamųjų nuskaitymų, turėjo labai trumpą geną (IGHJ5), kurio lūžio taškas buvo arti egzono pradžios, todėl reikėjo išskaidytų trumpų sugretinimų. Todėl nuosekliam aptikimui reikėjo daugiau nuskaitymų.

Lentelė 52 Suliejimų aptikimo riba

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

Splaisingo variantai

Dviejų RNR splaisingo variantų MET ir EGFR LoD buvo atitinkamai 18,7 ir 24,8 patvirtinamieji nuskaitymai.

Naviko kiekis

Tyrimo rezultatai formuluoja rekomendacijas dėl naviko kiekio klinikiniuose mėginiuose. Apskritai, kuo didesnis naviko kiekis, tuo didesnis „signalas“ (VAF, pokytis kartais arba patvirtinamieji nuskaitymai) navikų variantams. Minimalios rekomendacijos dėl naviko kiekio yra pagrįstos toliau pateiktomis pastabomis. Mažų DNR variantų

LoD vertės yra ne didesnės kaip 0,104 VAF (išskyrus TP53 intarpą). Norint aptikti navike esančias skatinamąsias mutacijas (0,50 varianto alelių dažnio), rekomenduojama 20 % naviko kiekio, kad šios mutacijos turėtų 0,10 VAF ir nebūtų žemiau LoD. Esant 20 % naviko kiekiui, genai, amplifikuoti iki 5,5 pokyčio kartų (11 kopijų), būtų nuosekliai aptinkami remiantis 1,8 pokyčio karto aptikimo riba. Esant 20 % naviko kiekiui, susiliejimai su 80 patvirtinamųjų nuskaitymų būtų nuosekliai aptinkami remiantis 16 patvirtinamųjų nuskaitymų aptikimo riba.

Atkuriamumas

Siekiant įvertinti ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ atkuriamumą, buvo atlikti du tyrimai. 1 tyrime buvo įvertinti RET maži DNR variantai, be NTRK ir RET suliejimo variantų. 2 tyrime buvo įvertinti papildomi naviko profiliavimo variantai.

1 tyrimas

Šis tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ atkuriamumą 3 tyrimo centruose (1 vidiniame, 2 išoriniame), po 2 operatorius vienoje vietoje, 2 tyrimo serijos pakartojimais ir 3 ne paeiliui einančias tyrimo dienas. Tyrimas buvo atliktas su atkuriamumo grupe, įskaitant DNR mėginius, kuriuose yra specifinių žinomų RET mažų DNR variantų, ir RNR mėginius, kuriuose yra specifinių žinomų NTRK1 – 3 ir RET suliejimo variantų iš formalinu fiksuotų, į parafiną įterptų (FFPE) audinių mėginių ir ląstelių linijų. Grupėje buvo DNR ir RNR grupių nariai, turintys mažą varianto lygį ir aukštą varianto lygį, kurių kiekvienos varianto klasės žemo ir aukšto lygio grupių narių skaičius buvo toks pat. Aukšto lygio grupės nariams buvo skirtas maždaug į 2–3 kartus didesnis už LoD lygis, o žemo lygio grupės nariams – maždaug LoD lygis. Kiekvienoje vietoje kiekvienas operatorius ištyrė grupės narius dukart po 3 kartus, gaudamas 6 stebėjimus vienam grupės nariui. Iš visų 3 vietų buvo gauti 36 stebėjimai vienam grupės nariui (3 vietos / prietaisai × 2 operatoriai × 2 serijos pakartojimai × 3 sekos dienos).

Teigiami identifikavimai procentais (PPC) ir neigiami identifikavimai procentais (PNC), skirti tiksliniams mažiems DNR variantams ir tiksliniams RNR suliejimo variantams aukštu lygiu buvo nustatyti kaip pagrindinės vertinamosios baigtys. PPC ir PNC, skirti tiksliniams mažiems DNR variantams ir tiksliniams RNR suliejimo variantams žemu lygiu, buvo apskaičiuoti kaip antrinės vertinamosios baigtys. Dvipusiai 95 % pasiklovimo intervalai (PI), susiję su visomis vertinamosiomis baigtimis, buvo apskaičiuoti naudojant Wilsono įverčio metodą. Pirminės analizės buvo atliktos siekiant įvertinti tikslinių aukšto lygio grupių narių PPC ir PNC (su atitinkamais 95 % PI), derinant konkretaus taikinio ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ stebėjimus grupių narių grupėje, atstovaujančioje atitinkamai variantų klasei (pvz., mažiems DNR variantams ir RNR suliejimams) visose vietose / prietaisuose, visiems operatoriams ir serijoms. Kiekvieno tikslinio varianto ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ stebėjimai su kitais grupės nariais aukštu lygiu, nukreiptu to paties tipo variantui, bet neturinčiam to paties varianto, kaip nustatyta daugumos taisykle, buvo sujungti su apskaičiuotais PNC. Žemo lygio tikslinių grupės narių bendras PPC ir PNC buvo nustatyti panašiu būdu.

RET maži DNR variantai

Aukšto lygio mažų DNR variantų grupių narių bendras PPC buvo 100,0 % (207/207; 95 % PI: 98,2 %–100,0 %) ([Lentelė 53](#)). Aukšto lygio mažų DNR variantų grupių bendras PNC buvo 100,0 % (1 035/1 035; 95 % PI: 99,6 % iki 100,0 %) ([Lentelė 54](#)). Mažo lygio tikslinių mažų DNR variantų grupių narių bendras PPC buvo 99,1 % (210/212; 95 % PI: 96,6 % iki 99,7 %), o bendras PNC buvo 100,0 % (1 026/1 026; 95 % PI: 99,6 % iki 100,0 %).

Lentelė 53 Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ PPC pagal RET mažų DNR variantų aptikimą aukšto ir žemo lygio tikslinės grupės nariuose

Variantų lygis	Variantų tipas	Tikslinis variantas (nukleotidas)	Tikslinis variantas (aminorūgštis)	n	Vidutinis VAF	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % PI*
Aukštas	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Aukštas	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Aukštas	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Aukštas	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Aukštas	Iškrita	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Aukštas	Intarpas	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Aukštas	Visi mažos DNR variantai, aukšti	Visi mažos DNR variantai, aukšti	Visi mažos DNR variantai, aukšti	207	Netaikoma	100,0 % (207/207)	(98,2 %, 100,0 %)
Žemas	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)

Variantų lygis	Varianto tipas	Tikslinis variantas (nukleotidas)	Tikslinis variantas (aminorūgštis)	n	Vidutinis VAF	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % PI*
Žemas	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 % (33/35)	(81,4 %, 98,4 %)
Žemas	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Žemas	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Žemas	Iškrita	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Žemas	Intarpas	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Žemas	Visi mažos DNR variantai, žemi	Visi mažos DNR variantai, žemi	Visi mažos DNR variantai, žemi	212	Netaikoma	99,1 % (210/212)	(96,6 %, 99,7 %)

Santrumpos: NT – netaikoma; VAF – varianto alelių dažnis.

* Dvipusis 95 % pasiklivimo intervalas apskaičiuojamas naudojant Wilsono įverčio metodą.

Lentelė 54 Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ PNC pagal RET mažų DNR variantų aptikimą aukšto ir žemo lygio tikslinės grupės nariuose

Variantų lygis	Varianto tipas	Tikslinis variantas (nukleotidas)	Tikslinis variantas (aminorūgštis)	n ¹	Neigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ²
Aukštas	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 % (173/173)	(97,8 %, 100,0 %)
Aukštas	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Aukštas	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Aukštas	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 % (172/172)	(97,8 %, 100,0 %)
Aukštas	Iškrita	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Aukštas	Intarpas	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Aukštas	Visi mažos DNR variantai, aukšti	Visi mažos DNR variantai, aukšti	Visi mažos DNR variantai, aukšti	1035	100,0 % (1 035/1 035)	(99,6 %, 100,0 %)
Žemas	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 % (177/177)	(97,9 %, 100,0 %)
Žemas	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 % (143/143)	(97,4 %, 100,0 %)
Žemas	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Žemas	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)

Variantų lygis	Varianto tipas	Tikslinis variantas (nukleotidas)	Tikslinis variantas (aminorūgštis)	n ¹	Neigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ²
Žemas	Iškrita	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_ E901del	178	100,0 % (178/178)	(97,9 %, 100,0 %)
Žemas	Intarpas	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_ T636dup	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Žemas	Visi mažos DNR variantai, žemi	Visi mažos DNR variantai, žemi	Visi mažos DNR variantai, žemi	1026	100,0 % (1 026/1 026)	(99,6 %, 100,0 %)

¹ Visi stebėjimai, surinkti iš grupių narių ir variantų derinių, kuriems dauguma identifikavimų yra neigiami (t. y. tiksliniai variantai, kuriuose yra suliejimų, kurių mažiau nei 50 % identifikavimų yra teigiami).

² Dvipusis 95 % pasiklovimo intervalas apskaičiuojamas naudojant Wilsono įverčio metodą.

Lentelė 55 pateikiama variantų alelių dažnių (VAF) dispersijos komponentų analizė, atliekant maždaug 36 kiekvieno grupės nario stebėjimus. Buvo apskaičiuotas standartinis nuokrypis (SN) ir variacijos koeficientas procentais (%VK; bendras ir kiekvienam šaltiniui) ir pateiktas kiekvienam tiksliniam RET mažos DNR variantui.

Lentelė 55 Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ dispersijos komponentų VAF analizė tikslinių mažo DNR variantų grupės nariams

Variantų lygis	Varianto tipas	Tikslinis variantas (nukleotidas)	Tikslinis variantas (aminorūgštis)	n	Vidutinis VAF	Vietos SN (%VK)	Operatorius SN (%VK)	Dienos SN (%VK)	Replikacijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
Aukštas	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 %)
Aukštas	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 %)
Aukštas	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 %)
Aukštas	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 %)
Aukštas	Iškrita	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 %)
Aukštas	Intarpas	chr10_43609946_T_TG TGCCGCAC	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 %)
Žemas	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 %)
Žemas	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 %)
Žemas	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 %)
Žemas	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 %)

Variantų lygis	Varianto tipas	Tikslinis variantas (nukleotidas)	Tikslinis variantas (aminorūgštis)	n	Vidutinis VAF	Vietos SN (%VK)	Operatorius SN (%VK)	Dienos SN (%VK)	Replikacijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
Žemas	Iškrita	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 %)
Žemas	Intarpas	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 ir RET suliejimai

Aukšto lygio RNR suliejimo grupės narių bendras PPC buvo 99,3 % (285/287; 95 % PI: 97,5 %–99,8 %) ([Lentelė 56](#)). Kiekvieno aukšto lygio grupės nario PPC buvo 100 %, išskyrus BCAN-NTRK1 grupės narį (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % PI: 81,9 %–98,5 %]). Aukšto lygio RNR suliejimo grupės narių bendras PNC buvo 100,0 % (1 724/1 724; 95 % PI: 99,8 % iki 100,0 %) ([Lentelė 57](#)). Žemo lygio tikslinio RNR suliejimo grupės narių bendras PPC buvo 95,4 % (272/285; 95 % PI: 92,3 %, 97,3 %), o bendras PNC buvo 100,0 % (1 851/1 851; 95 % PI: 99,8 % iki 100,0 %).

Lentelė 56 Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ PPC pagal NTRK ir RET suliejimų aptikimą aukšto ir žemo lygio tikslinės grupės nariuose

Variantų lygis	Tikslinis suliejimas	n	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % PI*
Aukštas	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Aukštas	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 % (34/36)	(81,9 %, 98,5 %)
Aukštas	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Aukštas	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Aukštas	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Aukštas	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Aukštas	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Aukštas	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Aukštas	Visi suliejimai, aukšti	287	36,5	99,3 % (285/287)	(97,5 %, 99,8 %)
Žemas	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 % (34/36)	(81,9 %, 98,5 %)
Žemas	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 % (29/36)	(65,0 %, 90,2 %)
Žemas	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 % (33/35)	(81,4 %, 98,4 %)

Variantų lygis	Tikslinis suliejimas	n	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % PI*
Žemas	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Žemas	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Žemas	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Žemas	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 % (35/36)	(85,8 %, 99,5 %)
Žemas	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 % (33/34)	(85,1 %, 99,5 %)
Žemas	Visi suliejimai, žemi	285	16,8	95,4 % (272/285)	(92,3 %, 97,3 %)

* Dvipusis 95 % pasiklivimo intervalas (PI) apskaičiuojamas naudojant Wilsono įverčio metodą.

Lentelė 57 Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ PNC pagal NTRK ir RET suliejimų aptikimą aukšto ir žemo lygio netikslinės grupės nariuose

Variantų lygis	Tiksliniai suliejimai	n ¹	Neigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ²
Aukštas	LMNA-NTRK1	180	100,0 % (180/180)	(97,9 %, 100,0 %)
Aukštas	BCAN-NTRK1	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Aukštas	ETV6-NTRK2	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Aukštas	TRIM24-NTRK2	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Aukštas	ETV6-NTRK3	144	100,0 % (144/144)	(97,4 %, 100,0 %)
Aukštas	BTBD1-NTRK3	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Aukštas	NCOA4-RET	215	100,0 % (215/215)	(98,2 %, 100,0 %)
Aukštas	CCDC6-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Aukštas	Visi suliejimai – aukšti	1724	100,0 % (1 724/1 724)	(99,8 %, 100,0 %)
Žemas	LMNA-NTRK1	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)
Žemas	BCAN-NTRK1	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Žemas	ETV6-NTRK2	250	100,0 % (250/250)	(98,5 %, 100,0 %)
Žemas	STRN-NTRK2	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Žemas	ETV6-NTRK3	177	100,0 % (177/177)	(97,9 %, 100,0 %)

Variantų lygis	Tiksliniai suliejimai	n ¹	Neigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ²
Žemas	BTBD1-NTRK3	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Žemas	NCOA4-RET	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)
Žemas	KIF5B-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Žemas	Visi suliejimai – žemi	1851	100,0 % (1 851/1 851)	(99,8 %, 100,0 %)

¹ Visi stebėjimai, surinkti iš grupių narių ir variantų derinių, kuriems dauguma identifikavimų yra neigiami (t. y. tiksliniai variantai, kuriuose yra suliejimų, kurių mažiau nei 50 % identifikavimų yra teigiami).

² Dvipusis 95 % pasiklikovimo intervalas (PI) apskaičiuojamas naudojant Wilsono įverčio metodą.

Lentelė 58 pateikiama patvirtinamųjų nuskaitymų dispersijos komponentų analizė iš maždaug 36 kiekvieno tikslinio suliejimo stebėjimų. Buvo apskaičiuotas ir pateiktas kiekvieno tikslinio suliejimo SN ir %VK (iš viso ir kiekvienam šaltiniui).

Lentelė 58 Ištirimo „TSO Comprehensive (EU)“ dispersijos komponentų patvirtinamųjų nuskaitymų analizė tikslinio RNR suliejimo grupės nariams

Variantų lygis	Suliejimas	n	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus SN (%VK)	Dienos SN (%VK)	Replikacijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
Aukštas	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9 %)	3,37 (9 %)	6,93 (18 %)	9,04 (24 %)	12,39 (33 %)
Aukštas	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41 %)	7,87 (23 %)	5,40 (16 %)	8,95 (27 %)	18,98 (57 %)
Aukštas	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33 %)	3,50 (14 %)	4,20 (17 %)	4,86 (20 %)	10,86 (44 %)
Aukštas	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31 %)	4,24 (12 %)	6,82 (19 %)	6,87 (19 %)	15,57 (43 %)
Aukštas	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20 %)	10,20 (18 %)	9,25 (16 %)	8,69 (15 %)	19,93 (35 %)
Aukštas	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5 %)	2,65 (8 %)	2,16 (7 %)	10,47 (32 %)	11,11 (34 %)
Aukštas	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13 %)	4,09 (11 %)	6,17 (17 %)	5,20 (14 %)	10,17 (28 %)
Aukštas	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22 %)	2,56 (8 %)	6,53 (20 %)	5,51 (16 %)	11,49 (34 %)
Žemas	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13 %)	0,00 (0 %)	2,74 (20 %)	4,37 (32 %)	5,47 (40 %)

Variantų lygis	Suliejimas	n	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus SN (%VK)	Dienos SN (%VK)	Replikacijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
Žemas	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17 %)	2,98 (18 %)	4,61 (27 %)	5,82 (34 %)	8,52 (50 %)
Žemas	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0 %)	3,41 (22 %)	3,83 (25 %)	4,39 (29 %)	6,75 (45 %)
Žemas	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13 %)	0,61 (5 %)	2,33 (17 %)	2,57 (19 %)	3,95 (29 %)
Žemas	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24 %)	3,46 (14 %)	0,00 (0 %)	6,39 (26 %)	9,44 (38 %)
Žemas	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	6,64 (37 %)	6,71 (37 %)
Žemas	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13 %)	1,03 (7 %)	0,00 (0 %)	5,11 (32 %)	5,61 (36 %)
Žemas	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12 %)	0,00 (0 %)	1,58 (10 %)	5,83 (35 %)	6,39 (39 %)

%VK – procentinis variacijos koeficientas.

SN – standartinis nuokrypis.

2 tyrimas

Antrasis tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ atkuriamumą 3 tyrimo centruose (2 išoriniuose ir 1 vidiniame), po 2 operatorius / prietaisus vienoje vietoje, su 3 unikalioms reagentų partijoms, per 4 tyrimo dienas (ne iš eilės) ir po 2 sekas mėginių bibliotekoje.

Tyrimas buvo atliktas naudojant iš 41 FFPE audinio mėginių ir 1 FFPE ląstelių linijos išskirtus DNR ir RNR mėginius (su 1 FFPE audinio mėginiu ir FFPE ląstelių linija, naudojama 2 grupių nariams sukurti). Audinių mėginius sudarė šie tipai: šlapimo pūslės, kaulo, smegenų, krūties, storosios žarnos, tuščiosios žarnos, inkstų, kepenų, plaučių, kiaušidžių, prostatos, odos, minkštojo audinio, skrandžio, skydliaukės ir gimdos. Iš viso buvo ištirti 44 grupių nariai, įskaitant DNR grupių narius su mažais DNR variantais (SNV, MNV, tarpai ir iškritos), genų amplifikacija, skirtingi TMB įverčiai, aukšti MSI įverčiai ir RNR grupių nariai su genų suliejimais ir splaisingo variantais. Dauguma grupių narių buvo žinomi tiksliniai variantai, kurių lygiai buvo maždaug 2–3 kartus didesni už varianto aptikimo ribą (~2–3× LoD).

LoD yra analizės koncentracija, kuriai esant stebimi tyrimo rezultatai yra teigiami (variantas aptinkamas atsižvelgiant į ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ ribinę vertę) ≥95 % laiko. Vidutinis stebėtas varianto lygis buvo klasifikuojamas kaip maždaug <2× LOD (stebimas varianto lygis esant < 1,5× LOD), ~2–3× LOD (stebimas varianto lygis nuo 1,5× LOD iki 3,4× LOD) ir maždaug >3× LOD (stebimas varianto lygis esant > 3,4× LOD).

Mažų DNR variantų, genų amplifikacijų, „MSI-high“ (MSI-H) ir RNR variantų teigiami identifikavimai procentais (PPC) buvo apskaičiuoti derinant stebėjimus sekvenavimo tyrimų serijose ir vietose. Neigiami identifikavimai procentais (PNC) buvo panašiai apskaičiuoti mažiems DNR variantams, genų amplifikacijoms ir RNR variantams.

Kiekvieno žinomo tikslinio varianto „TSO Comprehensive (EU)“ ištyrimo stebėjimai to paties tipo, bet su kitais variantais, kurie nėra gauti iš to paties šaltinio mėginio ir kurie neatitinka to varianto daugumos taisyklės (< 50 % identifikavimų buvo teigiami) grupės nariuose buvo apibendrinti sujungiant visų vietų, operatorių / prietaisų, dienų, reagentų partijų ir sekvenavimo sekų duomenis, kad būtų galima apskaičiuoti PNC. Dvipusiai 95 % pasiklovimo intervalai (PI) buvo apskaičiuoti naudojant Wilsono įverčio metodą.

Maži DNR variantai

Lentelė 59 pateikti tikslinių mažos DNR variantų PPC. PPC svyravo nuo 91,3 % BRAF SNV atveju iki 100 % daugumai mažos DNR variantų.

Lentelė 59 Ištirimo „TSO Comprehensive (EU)“ PPC pagal mažos DNR variantų aptikimą jungtinės tikslinės grupės nariuose

Stebėtas varianto lygis ¹	Varianto tipas	Tikslinis variantas (nukleotidas)	Tikslinis variantas (aminorūgštis)	Vidutinis VAF ²	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ³
~2-3xLOD	IŠKRITA	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 % (28/28)	(87,9 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	IŠKRITA	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 % (40/40)	(91,2 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	INTARPAS	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 % (32/32)	(89,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	INTARPAS	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs *9	0,100	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2xLoD	INTARPAS	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs *28	0,084	100,0 % (4/4)	(51,0 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 % (42/46)	(79,7 %, 96,6 %)
~2-3xLOD	IŠKRITA	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	IŠKRITA	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs *29	0,245	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	INTARPAS	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0,075	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)

Stebėtas varianto lygis ¹	Varianto tipas	Tikslinis variantas (nukleotidas)	Tikslinis variantas (aminorūgštis)	Vidutinis VAF ²	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ³
~2- 3xLOD	MNV	chr12_25398284_CC_ AT	KRAS G12I	0,111	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
~2- 3xLOD	INTARPAS	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs *12	0,146	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2- 3xLOD	IŠKRITA	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs *1	0,157	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
<2xLoD	INTARPAS	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 % (2/2)	(34,2 %, 100,0 %)
~2- 3xLOD	INTARPAS	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

¹ Varianto lygis, apskaičiuotas pagal vidutinį stebėtą varianto alelių dažnį.

² Vidutinis varianto alelių dažnis apskaičiuotas pagal stebėtus tyrimo rezultatus.

³ Dvipusis 95 % pasiklivimo intervalas apskaičiuojamas naudojant Wilsono įverčio metodą.

Mažos DNR variantų PNC buvo 100 %.

Lentelė 60 pateikta kiekvieno variacijos šaltinio VAF rezultatų ir visų grupės narių su mažos DNR variantais, bendros variacijos dispersijos komponentų analizė.

Lentelė 60 Mažos DNR variantų dispersijos komponentų VAF analizė tikslinių mažo DNR variantų grupės nariams

Tikslinis variantas	N	Vidutinis VAF	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus (vietos) SN (%VK)	Dienos (vietos, operatoriaus) SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Serijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
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)

Tikslinis variantas	N	Vidutinis VAF	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus (vietos) SN (%VK)	Dienos (vietos, operatoriaus) SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Serijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
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)

Buvo du maži DNR tiksliniai variantai, kurių stebėjimų skaičius buvo per mažas, kad būtų galima pritaikyti dispersijos komponentų modelį. Šių dviejų tikslinių variantų chr1_27024001_C_CG ir 0,001 chr17_7578470_C_CGGCGG bendras SN buvo 0,027.

Genų amplifikacija

[Lentelė 61](#) pateikti tikslinių genų amplifikacijų PPC. MET ir ERBB2 PPC buvo 100,0 %.

Lentelė 61 Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ PPC pagal genų amplifikacijų aptikimą jungtinės tikslinės grupės nariuose

Stebėtas varianto lygis ¹	Tikslinis variantas	Vidurkis stebimas pokytis kartais ²	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ³
~2-3xLOD	MET	5,14	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2xLoD	ERBB2	2,33	100,0 % (47/47)	(92,4 %, 100,0 %)

¹ Variantų lygis, apskaičiuotas pagal vidutinį stebėtą pokytį kartais.

² Vidutinis pokytis kartais, apskaičiuotas pagal stebėtus tyrimo rezultatus.

³ Dvipusis 95 % pasiklivimo intervalas apskaičiuojamas naudojant Wilsono įverčio metodą.

Visų genų amplifikacijų PNC buvo 100 %.

Lentelė 62 pateikta kiekvieno variacijos šaltinio pokyčio kartais rezultatų ir visų grupės narių su tikslinga genų amplifikacija, bendros variacijos dispersijos komponentų analizė.

Lentelė 62 Tikslinių geno amplifikacijų pokyčio kartais dispersijos komponentų analizė

Tikslinis variantas	N	Vidutinis pokytis kartais	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus (vietos) SN (%VK)	Dienos (vietos, operatoriaus) SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Serijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
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

Lentelė 63 pateikti tikslinių MSI-H grupių narių PPC. Abiejų MSI-H grupių narių PPC buvo 100 %.

Lentelė 63 Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ PPC pagal MSI-H būsenos aptikimą jungtinės tikslinės grupės nariuose

Grupės narys	Vidutinis MSI įvertis ¹	N	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
TPSBD6	55,7	32	100,0 % (32/32)	(89,3 %, 100,0 %)
Visi nariai		68	100,0 % (68/68)	(94,7 %, 100,0 %)

¹ Vidutinis stebimas MSI įvertis, apskaičiuotas pagal stebėtus tyrimo rezultatus.

² Dvipusis 95 % pasiklivimo intervalas apskaičiuojamas naudojant Wilsono įverčio metodą.

Lentelė 64 pateikta kiekvieno variacijos šaltinio MSI įverčio rezultatų ir visų grupės narių su MSI-H būsenos tikslu, bendros variacijos dispersijos komponentų analizė.

Lentelė 64 Tikslinių MSI-H grupės narių MSI įverčio dispersijos komponentų analizė

Grupės narys	N	Vidutinis MSI įvertis	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus (vietos) SN (%VK)	Dienos (vietos, operatoriaus) SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Serijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
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

Siekiant įvertinti TMB įverčių atkuriamumą, su tiksliniais TMB grupių nariais buvo atlikta kiekybinė įverčio analizė, kuri atitiko numatomų TMB įverčių intervalą. [Lentelė 65](#) pateikta kiekvieno variacijos šaltinio TMB įverčio rezultatų ir visų TMB grupės narių bendros variacijos dispersijos komponentų analizė. Vieno grupės nario TMB įverčio bendras SN buvo 1,0 (%VK = 13) (vidutinis TMB įvertis = 7,6), o kito – 1,1 (%VK = 2) (vidutinis TMB įvertis = 63,2).

Lentelė 65 Tikslinių TMB grupės narių TMB įverčio dispersijos komponentų analizė

Grupės narys	N	Vidutinis TMB įvertis	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus (vietos) SN (%VK)	Dienos (vietos, operatoriaus) SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Serijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
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)

Buvo vienas TMB grupės narys, kurio stebėjimų skaičius buvo per mažas (N = 2), kad būtų galima pritaikyti dispersijos komponentų modelį. Šio grupės nario bendras SN buvo 1,7.

RNR variantai

[Lentelė 66](#) pateikiami tikslinių RNR variantų PPC. PPC svyravo nuo 91,7 % KIF5B-RET atveju iki 100 % daugumai RNR variantų.

Lentelė 66 Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ PPC pagal RNR variantų aptikimą jungtinės tikslinės grupės nariuose

Stebėtas varianto lygis ¹	Varianto tipas	Tikslinis variantas	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai ²	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ³
~2-3xLOD	Suliejimas	ACPP-ETV1	44,7	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

Stebėtas varianto lygis ¹	Varianto tipas	Tikslinis variantas	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai ²	Teigiamų identifikavimų procentais (%)	95 % CI ³
~2-3xLOD	Suliejimas	DHX8;ETV4- STAT3	48,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	EML4-ALK	49,3	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	FGFR1-GSR	61,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2xLoD	Suliejimas	KIF5B-RET	11,6	91,7 % (44/48)	(80,4 %, 96,7 %)
<2xLoD	Suliejimas	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2xLoD	Suliejimas	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2xLoD	Suliejimas	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Suliejimas	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 % (47/48)	(89,1 %, 99,6 %)
~2-3xLOD	Splaisingo variantas	EGFR VIII	64,0	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2-3xLOD	Splaisingo variantas	MET 14 egzono praleidimas	61,2	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

¹ Varianto lygis, apskaičiuotas pagal vidutinį pastebėtą patvirtinamąjį nuskaitymą.² Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai, apskaičiuoti pagal stebėtus tyrimo rezultatus.

³ Dvipusis 95 % pasiklivimo intervalas apskaičiuojamas naudojant Wilsono įverčio metodą.

Kiekvieno tikslinio RNR varianto PNC buvo 100 %, išskyrus FGFR2-SRPK2 suliejimą (PNC = 99,60 % (984/988; 95 % PI: 98,96 % iki 99,84 %).

Lentelė 67 pateikta kiekvieno variacijos šaltinio patvirtinamojo nuskaitymo rezultatų ir visų grupės narių su RNR variantais, bendros variacijos dispersijos komponentų analizė.

Lentelė 67 Tikslinių RNR variantų patvirtinamųjų nuskaitymų dispersijos komponentų analizė

Tikslinis variantas	N	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus (vietos) SN (%VK)	Dienos (vietos, operatoriaus) SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Serijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
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)

Tikslinis variantas	N	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	Vietos SN (%VK)	Operatoriaus (vietos) SN (%VK)	Dienos (vietos, operatoriaus) SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Serijos SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
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 splaisingo variantas	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET 14 egzonas, praleidžiantis splaisingo variantą	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Vienos laboratorijos precizija

Buvo atlikti du tyrimai, siekiant įvertinti „TSO Comprehensive (EU)“ vienos laboratorijos preciziją. 1 tyrime buvo įvertinti NTRK ir RET suliejimai ir RET maži DNR variantai. 2 tyrime buvo įvertinti TMB ir MSI.

1 tyrimas

Vienos laboratorijos precizija buvo įvertinta pagal NTRK1–3 suliejimus (žemesnio laipsnio glioma, daugiaformė glioblastoma, miofibroblastinė sarkoma, sekrecinė krūties karcinoma), RET suliejimai (skydliaukės vėžys ir nežinomo vėžio odos audiniai) ir RET mažų DNR variantų (meduliarinis skydliaukės vėžys) su FFPE audiniais iš nurodytų vėžio formų. Kiekvienas mėginys buvo tiriamas dviem variantų lygiais: ~1x LoD (žemas variantų lygis) ir ~2–3x LoD (aukštas variantų lygis), išskyrus mėginį, kuriame yra CCDC6-RET – kuris buvo tiriamas tik esant žemam variantų lygiui. Kiekvienas kiekvieno tyrimo lygio mėginys buvo tiriamas dviem egzemplioriais kiekvienu bibliotekos paruošimo atveju ir tai atliko trys (3) operatoriai. Kiekvienas operatorius pradėjo bibliotekų rengimą tris (3) dienas ne iš eilės ir sekvenavo trimis (3) nurodytais „NextSeq 550Dx Instruments“. Buvo tirtos trys (3) reagentų partijos, gaunant po 54 stebėjimus vienu lygiu. Kai kuriais lygiais dėl negaliojančių bibliotekų buvo mažiau nei 54 stebėjimai.

Kokybinė analizė

Kokybinė variantų identifikavimo atitiktis buvo įvertinta atskirai pagal du konkretaus varianto variantų lygius, remiantis visų kintamųjų (operatorių, reagentų partijų, prietaisų, dienų ir pakartojimų) jungtiniais stebėjimais. Teigiami identifikavimai procentais (PPC) bei neigiami identifikavimai procentais (PNC) ir susijęs dvipusis 95 % pasiklovimo intervalas (Wilsono įvertis) apibendrinti [Lentelė 68](#) (maži DNR variantai) ir [Lentelė 69](#) (RNR suliejimai).

Esant aukštam variantų lygiui (~2–3x LoD), ištyrimas „TSO Comprehensive (EU)“ parodė 100 % rezultatą pagal visų tirtų variantų PPC ir PNC.

Esant žemam variantų lygiui (~1x LoD), mažų DNR variantų PPC svyravo nuo 83,3 % iki 98,1 %, o RNR suliejimų PPC svyravo nuo 90,7 % iki 100 %. Variantų, kurių PPC buvo < 95 %, VAF (RET C634Y ir RET D898_E901del) arba patvirtinamųjų nuskaitymų (NCOA4-RET ir BCAN-NTRK1) vidurkis buvo mažesnis už atitinkamas aptikimo ribas. Esant žemam variantų lygiui, 100 % PNC buvo pasiektas visų variantų atžvilgiu.

Lentelė 68 Tikslinių DNR variantų kokybiniai rezultatai

Variantų lygis	Variantas	Varianto tipas	Vidutinis VAF	PPC (95 % PI)	PNC (95 % PI)
Žemas (~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	IŠKRITA	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*	IŠKRITA	0,056	98,1 % (53/54) (90,2 %–99,7 %)	100,0 % (215/215) (98,2 %–100,0 %)

Variantų lygis	Variantas	Varianto tipas	Vidutinis VAF	PPC (95 % PI)	PNC (95 % PI)
Aukštas (~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	IŠKRITA	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*	IŠKRITA	0,161	100,0 % (32/32) (89,3 %–100,0 %)	100,0 % (214/214) (98,2 %–100,0 %)

* Nukleotido pokyčiai išvardyti pagal kiekvieną variantą aptikimo ribos tarpsnį, išskyrus RET D631_L633delinsE, kuris yra 10 chromosoma, 43609940 padėtis, referentinė ACGAGCT, A alternatyva.

Lentelė 69 Tikslinių RNR suliejimų kokybiniai rezultatai

Variantų lygis	Suliejimas	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	PPC (95 % PI)	PNC (95 % PI)
Žemas	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (537/537) (99,3 %, 100,0 %)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 % (51/54) (84,9 %, 98,1 %)	100,0 % (591/591) (99,4 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (591/591) (99,4 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (537/537) (99,3 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK3 (FFPE ląstelių linija)	23,1	98,1 % (53/54) (90,2 %, 99,7 %)	
	NCOA4-RET	13,3	90,7 % (49/54) (80,1 %, 96,0 %)	100,0 % (537/537) (99,3 %, 100,0 %)
	CCDC6-RET	18,7	98,1 % (53/54) (90,2 %, 99,7 %)	100,0 % (591/591) (99,4 %, 100,0 %)
Aukštas	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (481/481) (99,2 %, 100,0 %)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (535/535) (99,3 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (535/535) (99,3 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (481/481) (99,2 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK3 (FFPE ląstelių linija)	28,3	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	
	NCOA4-RET	24,8	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (481/481) (99,2 %, 100,0 %)
	CCDC6-RET	Netaikoma	Netirta	100,0 % (589/589) (99,4 %, 100,0 %)

Kiekybinė analizė

Buvo atlikta ribotos didžiausios tikimybės (REML) dispersijos komponentų analizė, siekiant įvertinti pagrindinio tęstinio kintamojo (mažų DNR variantų – VAF ir RNR suliejimų – patvirtinamųjų nuskaitymų) bendrą variaciją ir įvertinti kiekvieno variacijos šaltinio [operatorių, prietaisų, dienų, reagentų partijų, liekamasis ir bendras) precizijos komponentus [standartinį nuokrypį (SN), variacijos koeficientą (VK)]. Mažų DNR variantų rezultatai pateikiami [Lentelė 70](#), RNR suliejimų – [Lentelė 71](#).

VAF variacija padidėjo su vidurkiu, kaip tikėtasi pagal binominę proporciją. Patvirtinamųjų nuskaitymų variacija padidėjo su vidurkiu, kaip tikėtasi pagal skaičiavimo duomenis. Liekamasis komponentas turėjo didžiausią poveikį tiek mažų DNR variantų, tiek RNR suliejimų bendrai dispersijai abiem lygiais ir tai pagrindžia išvadą, kad šių variantų aptikimas „TSO Comprehensive (EU)“ mažai priklauso nuo operatorių, partijų, prietaisų ir dienų.

Lentelė 70 Kiekybiniai SN ir VK rezultatai pagal tikslinius mažus DNR variantus

VAF lygis	Variantas	Varianto tipas	N Galiojantys bandymai	Vidutinis VAF	Operatorius SN (%VK)	Prietaisas SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Dienos SN (%VK)	Liekamasis SN (%VK)	Iš viso SN (%VK)
Žemas (~1x LoD)	RET D898_E901del	IŠKRITA	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	IŠKRITA	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)

VAF lygis	Variantas	Varianto tipas	N Galiojantys bandymai	Vidutinis VAF	Operatorius SN (%VK)	Prietaisas SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Dienos SN (%VK)	Liekamasis SN (%VK)	Iš viso SN (%VK)
Aukštas (~3x LoD)	RET D898_E901del	IŠKRITA	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	IŠKRITA	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)

Lentelė 71 Kiekybiniai SN ir VK rezultatai pagal RNR suliejimus

Patvirtinamųjų nuskaitymų lygis	Suliejimas	N Galiojantys bandymai	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	Operatoriaus SN (%VK)	Prietaiso SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Dienos SN (%VK)	Liekamasis SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
Žemas	TPM3- NTRK1	54	20,2	2,3 (11,5)	0,9 (4,7)	3,3 (16,4)	0,8 (4,1)	5,7 (28,2)	7,1 (35,2)
	BCAN- NTRK1	54	22,1	3,4 (15,3)	1,4 (6,4)	1,8 (8,0)	0,0 (0,0)	6,0 (27,2)	7,3 (32,9)
	ETV6- NTRK2	54	20,3	0,0 (0,0)	3,2 (15,7)	4,4 (21,5)	0,0 (0,0)	8,3 (40,8)	9,9 (48,7)
	ETV6- NTRK3	54	16,2	2,3 (14,0)	2,4 (14,6)	2,2 (13,4)	0,0 (0,0)	4,7 (28,7)	6,1 (37,5)
	ETV6- NTRK3 (ląstelių linija)	54	23,1	4,6 (19,7)	1,2 (5,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	6,7 (29,1)	8,2 (35,5)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,7 (12,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,7 (12,6)	5,1 (38,3)	5,6 (42,2)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,0 (0,0)	1,1 (6,1)	5,4 (29,1)	0,0 (0,0)	6,2 (33,0)	8,3 (44,4)

Patvirtinamųjų nuskaitymų lygis	Suliejimas	N Galiojantys bandymai	Vidutiniai patvirtinamieji nuskaitymai	Operatoriaus SN (%VK)	Prietaiso SN (%VK)	Partijos SN (%VK)	Dienos SN (%VK)	Liekamasis SN (%VK)	Bendras SN (%VK)
Aukštas	TPM3- NTRK1	54	57,1	11,2 (19,6)	1,2 2,1	5,7 (9,9)	2,0 (3,5)	11,9 (20,8)	17,4 (30,5)
	BCAN- NTRK1	54	53,2	8,2 (15,5)	0,8 (1,4)	5,6 (10,5)	2,9 (5,4)	11,3 (21,3)	15,4 (28,9)
	ETV6- NTRK2	54	52	0,0 (0,0)	4,1 (7,8)	7,1 (13,6)	5,7 (11,0)	12,9 (24,9)	16,3 (31,4)
	ETV6- NTRK3	54	41,7	7,2 (17,2)	0,4 (1,0)	6,4 (15,4)	0,0 (0,0)	10,7 (25,8)	14,4 (34,6)
	ETV6- NTRK3 (ląstelių linija)	54	28,3	7,9 (28,0)	1,0 (3,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	9,1 (32,0)	12,1 (42,6)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,1 (12,3)	0,0 (0,0)	5,9 (23,9)	0,0 (0,0)	6,8 (27,3)	9,5 (38,3)

2 tyrimas

Buvo įvertinta vienos laboratorijos precizija pagal TMB ir MSI. Siekiant įvertinti preciziją skirtingais lygiais įverčių intervale, buvo naudojami penki TMB skirti NSCLC FFPE DNR mėginiai ir septyni MSI skirti CRC FFPE mėginiai, įskaitant ir mikrosatelito stabilų (MSS) ir „MSI-high“ (MSI-H). Kiekvieną mėginį dviem egzemplioriais tyrė trys (3) operatoriai, tris (3) dienas, su trimis (3) bibliotekų preparatais, naudojant tris (3) „NextSeq 550Dx Instruments“, gaunant po 54 stebėjimus vienu lygiu.

Kokybinė atitiktis buvo įvertinta pagal MSI būseną. Ištyrimas „TSO Comprehensive (EU)“ parodė 100 % atitiktį pagal teigiamų identifikavimų procentais ir neigiamų identifikavimų procentais dėl MSI būsenos rodiklius. TMB atveju ištyrimas „TSO Comprehensive (EU)“ pateikia TMB įvertį; kokybinė atitiktis netaikoma.

Bendra TMB ir MSI įverčių variacija, kartu su indėliu pagal šaltinį (prietaisai, operatoriai, partijos, dienos ir liekamasis), buvo kiekybiškai įvertinta naudojant dispersijos komponentų modelį įverčių rinkiniui. TMB standartinis nuokrypis (SN) ir variacijos koeficientas (VK) pagal lygį pateikti [Lentelė 72](#) TMB, o MSI – [Lentelė 73](#). Kai kuriais lygiais dėl negaliojančių bibliotekų buvo mažiau nei 54 stebėjimai.

Lentelė 72 Kiekybinio TMB įverčio SN ir VK rezultatai

Lygis	Vidutinis TMB įvertis	N Galiojantys bandymai	Operatorius SN (%VK)	Prietaisas SN (%VK)	Partija SN (%VK)	Diena SN (%VK)	Liekamasis SN (%VK)	Iš viso SN (%VK)
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 %)

Lentelė 73 Kiekybinio MSI įverčio SN ir VK rezultatai

MSI būseną	Lygis	Vidutinis MSI įvertis (%)	N Galiojantys bandymai	Operatorius SN (%VK)	Prietaisas SN (%VK)	Partija SN (%VK)	Diena SN (%VK)	Liekamasis SN (%VK)	Iš viso SN (%VK)
„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 būseną	Lygis	Vidutinis MSI įvertis (%)	N Galiojantys bandymai	Operatorius SN (%VK)	Prietaisas SN (%VK)	Partija SN (%VK)	Diena SN (%VK)	Liekamasis SN (%VK)	Iš viso SN (%VK)
„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 įverčių variacija turi tendenciją didėti kartu su vidurkiu, kaip tikimasi iš teorinių skaičiavimo duomenų pasiskirstymų. MSI įverčių variacija esant lygiams, artimiems MSI įverčiui = 50, yra didesnė nei MSI įverčių svyravimas arčiau 0 arba 100, o tai atitinka kintamumą pagal proporcių duomenų teorinį pasiskirstymą. Liekamojo komponento poveikis bendrai MSI ir TMB įverčių dispersijai išliko didžiausias ir tai pagrindžia išvadą, kad įverčiai mažai priklauso nuo operatorių, partijų, prietaisų ir dienų.

MSI C5 ir C95 vertės ties 20,00 % jautrumo riba buvo nustatytos naudojant precizijos profilį ([Lentelė 74](#)).

Lentelė 74 MSI C5-C95 intervalai

Įvertis	C5	C95
MSI	17,17 %	23,32 %

Tačiau, kadangi MSI ir TMB yra sudėtingi biologiniai žymenys, analitinis veiksmingumas gali skirtis priklausomai nuo mėginio. Tai reiškia, kad TMB variacija priklauso ne tik nuo TMB vertės, bet ir nuo mėginio variantų sudėties, pvz., varianto tipo (SNV, intarpas-iškrita) ir VAF lygio (artumo įtraukimo jautrumo ribai). Be to, MSI variacija priklauso ne tik nuo MSI vertės, bet ir nuo mėginio vietų sudėties, pvz., nestabilių vietų skaičiaus ir vietos nestabilumo laipsnio.

Buvo įvertintas naviko turinio poveikis TMB ir MSI įverčiams. Daugumai mėginių naviko kiekis ≥ 30 % turėjo neįtakojamą poveikį TMB įverčiams, didesniems nei maždaug 10 mutacijų vienoje megabazėje. Didėjant naviko kiekiui, TMB įverčiai išliko palyginti nepakitę. MSI-H mėginių atveju naviko kiekis parodė teigiamą tiesinę koreliaciją su MSI įverčiu. MSI-H mėginiai išliko vidutiniškai MSI-H, kai naviko kiekis buvo ≥ 30 %. Endometriumo mėginiai pasižymėjo aiškiu skirtingumu nuo kitų tipų audinių ir buvo nustatyta, kad reikia didesnio naviko kiekio, kad jie būtų identifikuoti MSI-H.

Naviko profiliavimo tikslumas

Alternatyvų aptikimas pagal „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimą buvo palygintas su referentinių metodų rezultatais. DNR maži variantai ir TMB buvo palyginti su išoriniu patvirtintu viso egzomo NGS metodu. Genų amplifikacijos buvo palygintos su tuo pačiu egzomo NGS metodu arba patvirtintu dvigubos in situ hibridizacijos (DISH) metodu HER2 amplifikacijoms. MSI buvo įvertinta pagal patvirtintą MSI-PCR testą. RNR splaisingo variantai buvo palyginti su patvirtintu kiekybiniu PCR (qPCR) metodu. ROS1 ir ALK suliejimai buvo palyginti su patvirtintais FISH tyrimais. Visi kiti suliejimai buvo palyginti su sudėtinu metodu, kurį sudarė patvirtintas RNR viso egzomo NGS tyrimas (RNGS1), tikslinė NGS plokštelė (RNGS2) ir lašelių skaitmeninė PCR (ddPCR).

Mažų DNR variantų aptikimas

Mažų DNR variantų aptikimas „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimu buvo palygintas su viso egzomo sekvenavimo (WES) rezultatais, kurie naudoja WES su suderintomis normaliomis naviko mėginių poromis nonocitų linijos ir somatiniais mažiems variantams identifikuoti. Mažų variantų, kuriuos sudaro vieno nukleotido variantai (SNV), tarpai ir iškritos, palyginimas buvo pagrįstas 124 mėginiais iš 14 skirtingų audinių tipų, kurie buvo tinkami tiek „TSO Comprehensive (EU)“, tiek WES. Multinukleotidų variantus (MNV, 2–3 bp), kuriems reikalingas fazių derinimas, gali aptikti „TSO Comprehensive (EU)“, bet ne WES tyrimas. „TSO Comprehensive (EU)“ MNV buvo vertinami kaip individualūs SNV pagal WES. Visų variantų identifikavimų atitikties varianto lygiu santrauka, įskaitant teigiamą procentinę sutaptį (PPA) ir neigiamą procentinę sutaptį (NPA), pateikta [Lentelė 75](#).

Lentelė 75 Mažų variantų identifikavimų, įvertintų pagal gonocitų liniją arba somatinę būseną, atitikties santrauka

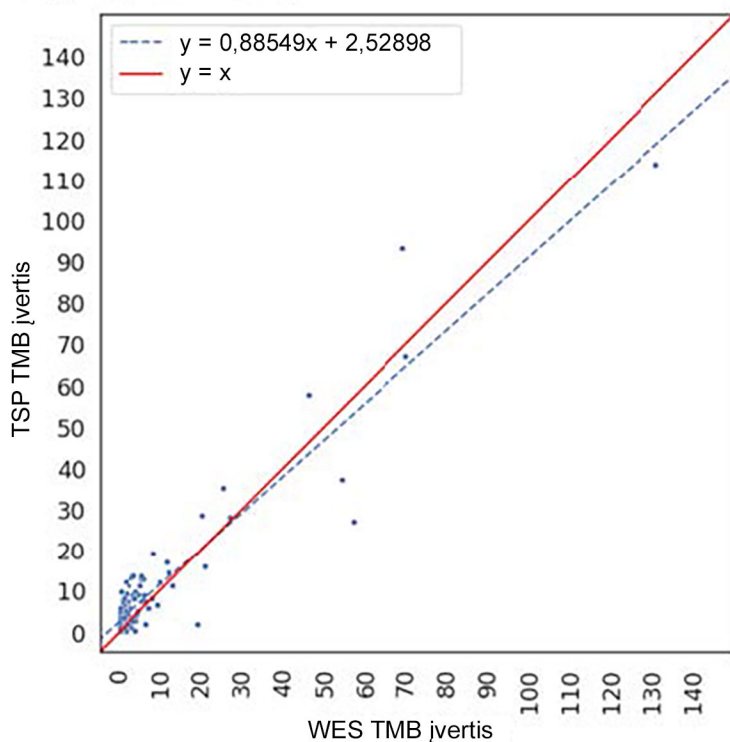
	WES somatiniai identifikavimai	WES gonocitų linijos identifikavimai	WES neidentifikuota
„TSO Comprehensive (EU)“ identifikuota	382	33,163	426
„TSO Comprehensive (EU)“ neidentifikuota	69	61	70000481
Iš viso	451	33,224	70000907
Procentinė sutaptis	PPA: 85 % (382/451), 95 % PI: [81 %–87 %]	PPA: >99 % (33 163/33 224) 95 % PI: [99,8 %–99,9 %]	NPA: >99 % (70 000 481/70 000 907) 95 % PI: [99,999 %–99,999 %]

Iš viso „TSO Comprehensive (EU)“ identifikavo 426 variantus, kurie nebuvo aptikti WES metodu. Du šimtai keturi (48 %) šių variantų alelio dažniai buvo mažesni už WES metodo identifikavimo slenkstį. Iš likusių galimų klaidingai teigiamų variantų WES metodu buvo įrodytas žemo palaikymo variantų identifikavimas. Be to, daugelis variantų turėjo labai žemo lygio WES įrodymus sutampančiuose normaliuose mėginiuose. Šis rezultatas rodo, kad šiuos variantus navike WES praleido dėl įprasto užteršimo naviko.

Naviko mutacinės naštos aptikimas

TMB atitiktis buvo nustatyta lyginant TMB įverčius (somatinės mutacijas / megabazę), gautus WES metodu ir „TSO Comprehensive (EU)“ atliktus 124 mėginių tyrimus su turimais tiek „TSO Comprehensive (EU)“, tiek WES duomenimis. Tiesinės regresijos analizė su WES, kaip prediktoriumi, y ašies kirtimo taškas buvo 2,53, nuolydis – 0,89, Pearsono koreliacijos koeficientas – 0,94 (Pav. 3.).

Pav. 3 TMB įverčio koreliacija tarp WES ir „TSO Comprehensive (EU)“



Genų amplifikacijos aptikimas

„TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo metu aptikta genų amplifikacija buvo palyginta su to paties WES tyrimo rezultatais, naudojant normalaus naviko sutampančius mėginius arba tik naviko mėginius. Iš viso buvo 420 mėginių, iš kurių 183 naudojo ortogonalinį normalaus naviko metodą, o 237 – tik naviko metodą. Mėginiai buvo paimti iš 14 audinių tipų ir juose buvo 55 genų amplifikacijos. „TSO Comprehensive (EU)“ praneša apie genų amplifikacijas iš MET ir ERBB2 genų. Tačiau tikslumas buvo įvertintas pagal visus 55 genus. Genų amplifikacijos identifikavimų santrauka pateikta [Lentelė 76](#).

Lentelė 76 Genų amplifikacijos identifikavimai

	WES teigiamas	WES neigiamas
„TSO Comprehensive (EU)“ Teigiamas	337	415
„TSO Comprehensive (EU)“ Neigiama	28	24,000
Iš viso	365	24,415
Procentinė sutaptis	PPA: 92 % (337/365) 95 % PI: [89 %, 95 %]	NPA: 98,3 % (24 000/24 415) 95 % PI: [98,1 %, 98,5 %]

ERBB2 (HER2) amplifikacijos iš skrandžio ir krūties audinių buvo analizuojamos atskirai nuo kitų genų amplifikacijų naudojant dvigubos in situ hibridizacijos metodą (DISH). Iš viso buvo ištirti 116 krūties ir skrandžio mėginių, iš kurių 64 anksčiau IHC arba FISH buvo apibūdinti kaip HER2 teigiami. Vieno mėginio išskyrimas nepavyko, 4 mėginių nepavyko patvirtinti kaip tinkamų „TSO Comprehensive (EU)“, o 3 mėginių nepavyko patvirtinti kaip tinkamų DISH tyrimui. Iš 108 mėginių 20-ies (18,5 %) įverčiai buvo ribiniai (nuo 1,5 iki 2,5) – netoli DISH jautrumo ribos (2,0). Visų mėginių atitikties rezultatai, įskaitant PPA, NPA, išskyrus ribinius HER2 DISH atvejus, pateikti [Lentelė 77](#).

Lentelė 77 TSO Comprehensive ir HER2 DISH, įskaitant HER2 geno amplifikaciją, suderinamumo santrauka

HER2 geno amplifikacija Visi (krūties ir skrandžio)	HER2 DISH amplifikuotas	HER2 DISH neamplifikuotas
„TSO Comprehensive (EU)“ Teigiamas	17 (įskaitant 1 ribinį)	13 (įskaitant 1 ribinį)
„TSO Comprehensive (EU)“ Neigiama	10 (įskaitant 6 ribinius)	68 (įskaitant 12 ribinių)
Procentinė sutaptis, įskaitant ribinius atvejus	PPA: 63 % (17/27) 95 % PI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % PI: [74 %, 90 %]
Procentinė sutaptis, neįskaitant ribinių atvejų	PPA: 80 % (16/20) 95 % PI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % PI: [72 %, 90 %]

Mikrosatelitų nestabilumo aptikimas

Tyrimu „TSO Comprehensive (EU)“ aptinkamas mikrosatelitų nestabilumas buvo palygintas su patvirtinto MSI-PCR tyrimo, kuriame tyrimams naudojami naviko normaliai suderinti mėginiai, rezultatais. Iš viso buvo palyginti 195 mėginiai, atitinkantys naviko kiekio reikalavimą (≥ 30 %) ir reprezentuojantys 14 audinių tipų. MSI-PCR įvertina 5 vietas ir duoda 3 rezultatus – MSS (nėra nestabilių vietų), „MSI-Low“ (viena nestabili vieta) ir „MSI-High“ (dvi arba daugiau nestabilių vietų). „TSO Comprehensive (EU)“ įvertina iki 130 mikrosatelitų vietų ir tik klasifikuoja mėginius kaip MSS arba „MSI-High“ (≥ 20 % nestabilių vietų). MSI-PCR reikmėms „MSI-Low“ buvo sugrupuotos su MSS rezultatais. Atitikties analizė pateikta [Lentelė 78](#).

Lentelė 78 „TSO Comprehensive (EU)“ ir MSI-PCR DNR mikrosatelitų nestabilumo rezultatų atitikties analizės santrauka

MSI nestabilumas	PCR „MSI-High“	PCR „MSI-Low“	PCR MSS
„TSO Comprehensive (EU)“ Nestabili („MSI-High“)	40	2	0
„TSO Comprehensive (EU)“ Stabilus (MSS)	3	0	150
Iš viso	43	2	150
Procentinė sutaptis	PPA: 93 % (40/43) 95 % PI: [81 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % PI: [95 %, >99 %]	

RNR splaisingo variantų aptikimas

Splaisingo variantų aptikimo tikslumas buvo apskaičiuotas lyginant EGFRvIII ir Met Exon 14del „TSO Comprehensive (EU)“ rezultatus su qPCR tyrimais, įskaitant vieną žinomą teigiamą RNR kiekvienam iš splaisingo variantų. Atitikties analizė buvo atlikta iš viso 230 unikalių FFPE RNR mėginių iš 14 audinių tipų, turimų duomenų tiek „TSO Comprehensive (EU)“ ir referentiniu metodu. Visų mėginių buvo ištirtas MET Exon 14del, o EGFRvIII – tik smegenų audiniuose. Trijų mėginių, kuriuos kaip MET Exon 14del teigiamus identifikavo qPCR, bet ne „TSO Comprehensive (EU)“, vidutinis Ct buvo >37 ir buvo mažesnis už „TSO Comprehensive (EU)“ LoD lygį. [Lentelė 79](#) apibendrinami atitikties tyrimo rezultatai.

Lentelė 79 „TSO Comprehensive (EU)“ ir qPCR tyrimo RNR splaisingo variantų rezultatų analizės santrauka

RNR splaisingo variantai	qPCR teigiamas	qPCR neigiamas
„TSO Comprehensive (EU)“ Teigiamas (EGFRvIII)	3	0
„TSO Comprehensive (EU)“ Neigiamas (EGFRvIII)	0	13
„TSO Comprehensive (EU)“ Teigiamas (Met Exon 14Del)	1	0
„TSO Comprehensive (EU)“ Neigiamas (Met Exon 14Del)	3	217
Iš viso	7	230
Procentinė sutaptis	PPA: 57 % (4/7) 95 % PI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % PI: [98 %, 100 %]

RNR suliejimo aptikimas

Palyginimas su sudėtinu metodu

„TSO Comprehensive (EU)“ suliejimai buvo lyginami su sudėtinu metodu, kurį sudarė visos RNR egzomų sekvenavimas naudojant NGS plokštelę (RNGS1), tikslinę NGS suliejimo plokštelę (RNGS2) ir lašelių skaitmeninę PCR (ddPCR).

RNGS1 metodas persidengia su visais genais, kurių suliejimas gali būti aptiktas naudojant „TSO Comprehensive (EU)“. Tačiau RNGS1 metodo aptikimo riba buvo 4X–8X didesnė už „TSO Comprehensive (EU)“, atsižvelgiant į patvirtinamųjų nuskaitymų, stebėtų persidengiančiuose suliejimo identifikavimuose, skaičių. Taigi, su WES (RNGS1) metodu buvo taikomas sudėtinis metodas iš dviejų papildomų metodų, turinčių didesnę jautrumą, bet mažesnę suliejimo plotį.

Iš viso RNGS1 buvo ištirti 255 unikalūs RNR mėginiai, atitinkantys 14 audinių tipų ir atitinkančių „TSO Comprehensive (EU)“ metrikas. Du mėginiai buvo netinkami RNGS1 mėginio kokybės kontrolei ir neįtraukti į papildomą analizę. 4 iš 82 suliejimų, kuriuos identifikavo „TSO Comprehensive (EU)“, buvo neįtraukti į vertinimą dėl RNGS1 mėginio kokybės kontrolės trikčių, o 7 papildomi suliejimai nebuvo identifikuoti dėl to, kad RNGS1 grupėje nebuvo tikslių verčių. RNGS1 patvirtino 9 iš likusių 71 suliejimo atvejų, kuriuos identifikavo „TSO Comprehensive (EU)“. RNGS1 identifikavo 4 suliejimų, kurių neidentifikavo „TSO Comprehensive (EU)“.

Iš 62 suliejimų, kurie pagal „TSO Comprehensive (EU)“ buvo teigiami ir kurių neaptiko RNGS1, 13 persidengė ir buvo patvirtinti RNGS2. Vieną suliejimą identifikavo RNGS2, tačiau „TSO Comprehensive (EU)“ jo neidentifikavo.

Tada lašelių skaitmeninė PCR buvo naudojama suliejimams, kuriuos identifikavo „TSO Comprehensive (EU)“ ir kurių RNGS1 neidentifikavo arba kurie buvo negalimi identifikuoti, ir negalimi įvertinti RNGS2 (49). Be to, ddPCR buvo naudojama pakartotinai įvertinti 2 iš 4 klaidingai neigiamiems suliejimams, nustatytiems „TSO Comprehensive (EU)“ su RNGS1, ir 2 iš 9 atitinkančių suliejimų, nustatytų „TSO Comprehensive (EU)“ ir RNGS1. Į kiekvieno teigiami suliejimo mėginio tyrimą buvo įtraukti penki neigiami suliejimo mėginiai, siekiant užtikrinti specifiškumą. Aštuoniolika suliejimų nebuvo ištirti su ddPCR dėl nesugebėjimo sukurti pradmenų / zondu, kelių suliejimo genų partnerių arba nepakankamos likusios FFPE medžiagos. ddPCR atveju pradmenys ir zondai buvo sukurti atsižvelgiant į tyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ pastebėtus lūžio taškus.

Iš viso 52 suliejimai buvo aptikti ddPCR, 41 iš jų suliejimų buvo identifikuoti „TSO Comprehensive (EU)“, bet neidentifikuoti arba negalimi identifikuoti RNGS1. Devyni suliejimai identifikuoti ddPCR, tačiau neigiami „TSO Comprehensive (EU)“ arba RNGS1. Du ddPCR teigiami suliejimai patvirtino „TSO Comprehensive (EU)“ ir RNGS1 2 sutampančius suliejimus. ddPCR neaptiko 2 pakartotinai įvertintų „TSO Comprehensive (EU)“ klaidingų neigiamų rezultatų su RNGS1; tačiau remiantis RNGS1 palyginimu, jie buvo skaičiuojami kaip klaidingi neigiami.

Sudėtiniai RNGS1, RNGS2 ir ddPCR suliejimų atitikties rezultatų metodai pateikti [Lentelė 80](#).

63 suliejimai, atitinkantys sudėtinį metodą, „TSO Comprehensive (EU)“ grupėje atstovavo 43 genus. Tačiau suliejimai gali būti registruojami tik iš 23 genų, nurodytų [„TSO Comprehensive \(EU\)“ Tyrimo genų grupė 2 psl.](#)

Lentelė 80 RNR suliejimų rezultatų, gautų „TSO Comprehensive (EU)“ ir sudėtiniais metodais kryžminio palyginimo lentelė (253 mėginiai)

Suliejimai	Teigiamas pagal sudėtinį metodą	Neigiamas pagal sudėtinį metodą
„TSO Comprehensive (EU)“ Teigiamas	63 ¹	18
„TSO Comprehensive (EU)“ Neigiamas	14 ²	13,821
Iš viso	77	13,839
Procentinė sutaptis	PPA: 82 % (63/77) 95 % PI: [72 %, 89 %]	NPA: 99,9 % (13 821/13 839) 95 % PI: [99,8 %, 99,9 %]

¹ 63 „TSO Comprehensive (EU)“ tikrieji teigiami = 9 teigiami, atitinkantys RNGS1 + 13 teigiami, atitinkantys RNGS2 + 41 teigiami, atitinkantys ddPCR.

² 14 „TSO Comprehensive (EU)“ klaidingų neigiamų = 4 neigiami, neatitinkantys RNGS1 + 1 neigiami, neatitinkantys RNGS2 + 9 neigiami, neatitinkantys ddPCR.

Palyginimas su ROS1 ir ALK suliejimu FISH metodu

FISH buvo ištirti 25 NSCLC mėginiai, taikant tiek ROS1, tiek ALK suliejimą, o 5 papildomi NSCLC mėginiai buvo ištirti dėl ROS1 suliejimo. Aštuonių mėginių tyrimas FISH dėl ROS1 nepavyko, nes buvo nepakankamai audinio. Du ROS1 ir vienas ALK suliejimas buvo aptikti tiek „TSO Comprehensive (EU)“, tiek FISH. Neatitinkančių rezultatų nebuvo pastebėta. [Lentelė 81](#) apibendrinami ROS1 „TSO Comprehensive (EU)“ ir ALK suliejimo metodų ir FISH metodų atitikties rezultatai.

Lentelė 81 ROS1 ir ALK suliejimo atitikties rezultatų „TSO Comprehensive (EU)“ ir FISH metodo santrauka

ALK+ROS1	FISH teigiamas	FISH neigiamas
„TSO Comprehensive (EU)“ Teigiamas	3	0
„TSO Comprehensive (EU)“ Neigiamas	0	44
Iš viso	3	44
Procentinė sutaptis	PPA: 100 % (3/3) 95 % PI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % PI: [92 %, 100 %]

Mėginio validumas

Mėginio tinkamumas (pirmasis bandymas) buvo išmatuotas tiriant 181 unikalios RNR ir 272 unikalios DNR mėginius iš ≤5 metų amžiaus FFPE blokų. Šie mėginiai buvo pasirinkti pagal audinio tipą ir turimą medžiagą; tyrimo validumas nežinomas. Kad varianto tipas būtų laikomas galiojančiu, jis turi atitikti bibliotekos KK metrikas. Mėginio validumas buvo vertinamas atskirai pagal kiekvieną varianto tipą (maži DNR variantai / TMB, MSI, genų amplifikacijos, suliejimai / splaisingo variantai) ir parodytas [Lentelė 82](#).

Lentelė 82 Mėginio validumas

Varianto tipas	Mėginio validumas
Suliejimai / splaisingo variantai (RNR)	76 %
Maži DNR variantai / TMB	75 %
MSI	72 %
Genų amplifikacija	94 %

Naviko profiliavimo pareiškimų analitinio patvirtinimo santrauka

Remiantis aptikimo ribos, tikslumo, atkuriamumo ir tikslumo duomenimis, „TSO Comprehensive (EU)“ analitiškai validuojamas šiems tyrimams:

- Maži DNR variantai: SNV, MNV, intarpai ir iškritos.
- TMB
- MSI
- MET ir ERBB2 (HER2) genų amplifikacijos (žr. „[TSO Comprehensive \(EU\)“ Tyrimo genų grupė 2 psl.](#)).
- 23 genai, dėl kurių galima aptikti suliejimus (žr. „[TSO Comprehensive \(EU\)“ Tyrimo genų grupė 2 psl.](#)).
- EGFG ir MET splaisingo variantai (žr. „[TSO Comprehensive \(EU\)“ Tyrimo genų grupė 2 psl.](#)).

NTRK klinikinis veiksmingumas

Siekiant patvirtinti „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimą kaip gretutinę diagnostiką (CDx), skirtą atrinkti „VITRAKVI“ (larotreklinibu) gydyti tinkamus pacientus, buvo ištirti mėginiai iš pacientų, įtrauktų į larotreklinibo klinikinius tyrimus (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; bendrai vadinami larotreklinibo tyrimo mėginiais), imant 2019 m. liepos 15 d. kaip duomenų fiksavimo pabaigą, papildyti komerciškai gautais FFPE audinių mėginiais, kad būtų galima padėti „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo tikslumo tyrimui ir klinikiniam susiejimo tyrimui.

NCT02122913 buvo daugiacentris atviras 1 fazės dozės didinimo tyrimas su suaugusiais pacientais, turinčiais pažengusių solidinių navikų (visų dalyvių), kurie nebuvo atrinkti dėl NTRK suliejimo teigiamo rezultato vėžio. Po tyrimo dozės didinimo dalies buvo pradėtas dozės didinimas pacientams, kuriems dokumentuotas NTRK suliejimo teigiamo rezultato vėžys, ir pacientams, kuriems, tyrėjo manymu, gali būti naudingas labai selektyvus TRK inhibitorius. NAVIGATE NCT02576431 yra tebevykstantis daugiacentris atviras 2 fazės kaupinis tyrimas su 12 metų ir vyresniais pacientais, turinčiais pasikartojančių pažengusių solidinių navikų ir dokumentais patvirtintą NTRK suliejimą, kaip įvertinta išorinės laboratorijos. SCOUT NCT02637687 yra tęstinis daugiacentris atviras 1/2 fazės tyrimas, skirtas vaikams nuo gimimo iki 21 metų, turintiems pažengusių solidinių arba pagrindinių centrinės nervų sistemos (CNS) navikų.

Iš NTRK suliejimo teigiamo rezultato pacientų, įtrauktų į „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimą, 164 sudarė larotreklinibo išplėstą pagrindinį veiksmingumo imtį (ePAS4).

NTRK1, NTRK2, NTRK3 suliejimo aptikimo tikslumo tyrimas

Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ tikslumas pacientų, sergančių solidiniais navikais, NTRK suliejimams (NTRK1, NTRK2 arba NTRK3) aptikti buvo įvertinus NTRK suliejimo rezultatų suderinamumą palyginant „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo ir patvirtinto ortogonalios metodo, pagrįsto NGS.

Buvo atliktas retrospektyvus, neintervencinis tyrimas. Larotrekcinio tyrimo mėginiai ir papildomi mėginiai buvo tiriami naudojant „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimą viename išoriniame tyrimo centre ir ortogonaliumi metodu centrinėje laboratorijoje. Ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ NTRK suliejimo identifikavimų tikslumas buvo apskaičiuotas pagal ortogonalų metodą; buvo apskaičiuota teigiama procentinė sutaptis (PPA), neigiama procentinė sutaptis (NPA) ir susiję dvipusiai 95 % pasiklovimo intervalai (PI).

Naudojant „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimą ir (arba) ortogonalų metodą buvo ištirta 516 mėginių. Iš šių mėginių 499 buvo ištirti abiem metodais. Septyniolika iš 516 mėginių nebuvo tiriami vienu iš tyrimų dėl nepavykusio išskyrimo, nežinomos priežasties (dėl ortogonalios metodo) arba nukrypimo nuo protokolo. Iš 499 mėginių, tirtų abiem metodais, 170 (34,1 %) buvo larotrekcinio tyrimo mėginiai, o 329 (65,9 %) – papildomi mėginiai.

499 mėginių rezultatų kryžminis palyginimas pateiktas [Lentelė 83](#). Iš 499 mėginių 85 mėginių „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatai buvo negaliojantys; iš šių 85, 53 mėginių rezultatai buvo negaliojantys ir taikant ortogonalų metodą. Papildomų 7 mėginiai rezultatai negaliojo pagal ortogonalų metodą. Taigi, taikant abu metodus, 407 iš 499 mėginių gauti galiojantys rezultatai.

Lentelė 83 NTRK tikslumo tyrimas: NTRK suliejimo aptikimo „TSO Comprehensive (EU)“ gautų rezultatų kryžminis palyginimas su ortogonaliumi metodo rezultatu

„TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatas	Ortogonalios metodo rezultatas			
	NTRK suliejimas teigiamas	NTRK suliejimas neigiamas	Negaliojantis	Iš viso
NTRK suliejimas teigiamas	114	16	1	131
NTRK suliejimas neigiamas	4	273	6	283
Negaliojantys*	4	28	53	85
Iš viso	122	317	60	499

* „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo negaliojantys rezultatai gauti iš mėginio ir tyrimo lygio.

Sutapties analizės, išskyrus ir įskaitant negaliojančius „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatus, parodytos [Lentelė 84](#). Išskyrus negaliojančius „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatus, PPA buvo 96,6 % (114/118; 95 % PI: 91,5 % – 99,1 %) ir NPA buvo 94,5 % (273/289; 95 % PI: 91,2 % – 96,8 %).

Lentelė 84 NTRK tikslumo tyrimas: „TSO Comprehensive (EU)“ Tyrimo PPA ir NPA, palyginti su ortogonalus metodo rezultatu NTRK suliejimams aptikti

Sutapties matas	Neįskaitant negaliojančių „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatų		Įskaitant negaliojančius „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatus	
	Sutaptis, % (n/N)	95 % PI*	Sutaptis, % (n/N)	95 % PI*
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 % PI, remiantis (tikslu) Clopperio ir Pearsono metodu.

NTRK1, NTRK2, NTRK3 suliejimo aptikimo klinikinis susiejimo tyrimas

„TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo NTRK1, NTRK2 arba NTRK3 suliejimų nustatymo pacientams, sergantiems solidiniais navikais, kuriems gali būti naudingas gydymas larotreklinibu, klinikinis pagrįstumas buvo įrodytas klinikiname susiejimo tyrime. Tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo klinikinį veiksmingumą nustatant NTRK1, NTRK2 arba NTRK3 suliejimo teigiamo rezultato pacientus gydyti larotreklinibu, ir įvertinti „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo ir vietinių tyrimo (LT) metodų (naudotų NTRK suliejimo būsenai nustatyti atliekant larotreklinibo klinikinius tyrimus) atitiktį.

LT metodai apėmė NGS, fluorescencinę in situ hibridizaciją (FISH), polimerazės grandininę reakciją (PCR) ir „NanoString“ tyrimus. Pacientų, sergančių kūdikių fibrosarkoma, kuriems buvo dokumentuota FISH būdu nustatyta ETV6 translokacija, NTRK suliejimų (ETV6 NTRK3) rezultatai buvo numanomi. Dauguma 235 larotreklinibo tyrimo pacientų, kuriems nustatyta NTRK suliejimo būklė, buvo ištirti NGS metodais.

Į tyrimus NAVIGATE NCT02576431 ir SCOUT NCT02637687 toliau įtraukiami dalyviai. Nuo 2019 m. liepos 15 d., kai duomenų rinkimas buvo nutrauktas, buvo įtraukti 279 pacientai. Iš 279 pacientų 208 NTRK suliejimo rezultatai buvo teigiami. Iš 208 teigiamo rezultato pacientų 164 suformavo larotreklinibo ePAS4,

Pagrindinė larotreklinibo veiksmingumo analizės vertinamoji baigtis buvo bendras atsako dažnis (BAD) pagal nepriklausomo peržiūros komiteto (NPK) vertinimą, sujungus trijų klinikinių tyrimų duomenis į rinkinį. BAD buvo įvertintas pagal dalį pacientų, patyrusių bendrą geriausią atsaką: patvirtintą visišką atsaką arba patvirtintą dalinį atsaką pagal RECIST 1.1 versijos kriterijus. Larotreklinibo ePAS4 BAD buvo 72,6 % (95 % PI [65,1 %, 79,2 %]) ir apėmė pacientus, turinčius 16 skirtingų navikų tipų.

Mėginių apskaita

Į mėginių rinkinį buvo įtraukti įvairūs navikų tipai ir vaikų bei suaugusiųjų pacientų mėginiai.

Nuo 2019 m. liepos 15 d. į larotreklinibo tyrimus buvo įtraukti 279 pacientai. Iš jų 235 pacientų buvo žinoma NTRK suliejimo būsena, nustatyta LT metodu: 208 buvo teigiamo rezultato, o 27 – neigiamo. 44 pacientų NTRK suliejimo būklė nebuvo žinoma, nes tyrimų NCT02122913 ir SCOUT NCT02637687 dozės didinimo fazėse pacientų tinkamumo tirti nereikėjo. Atliekant ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ klinikinį susiejimo tyrimą, jam buvo tinkami mėginiai iš iki 2019 m. liepos 15 d. įtrauktų larotreklinibo tyrimo pacientų, kurių NTRK suliejimo būklė buvo žinoma (208 teigiamo ir 27 neigiamo rezultato pacientai), ir papildomi mėginiai, nustatyti kaip neigiami pagal tipinius LT metodus.

Iš 208 teigiamo rezultato larotrekcinibo tyrimo mėginių 154 mėginius buvo galima ištirti „TSO Comprehensive (EU)“. Iš jų 138 rezultatai buvo galiojantys. Penkiolika mėginių buvo negaliojantys dėl neatitikimo mėginių sekos kokybės metrikoms ir 1 mėginys nebuvo tirtas dėl nukrypimo nuo protokolo. Iš 27 teigiamo rezultato larotrekcinibo tyrimo mėginių 24 mėginius buvo galima ištirti. Iš jų 22-ų ištyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ rezultatai buvo galiojantys. Du mėginiai buvo negaliojantys dėl neatitikimo mėginių sekos kokybės metrikoms. Papildomi mėginiai buvo atrinkti naudojant vieną iš dviejų reprezentatyvių LT metodų. Buvo gauta daugiau nei 350 mėginių ir ištirta, ar nėra naviko. Iš papildomų mėginių, atitinkančių mėginių reikalavimus, 266 buvo sėkmingai išskirti ir patvirtinta, kad reprezentatyviu LT metodu NTRK suliejimo rezultatas yra neigiamas. Iš šių mėginių 260 buvo galima naudoti ištyrimui „TSO Comprehensive (EU)“, o iš jų 222 turėjo galiojančius rezultatus. 38 mėginiai buvo negaliojantys dėl neatitikimo mėginių sekos kokybės metrikoms (n = 25) arba nesėkmingo serijos sekvenavimo (n = 13). Iš viso NTRK suliejimų neigiamo rezultato rinkinį sudarė 222 papildomi mėginiai ir 22 larotrekcinibo tyrimo mėginiai.

Atitikties rezultatai

Iš viso „TSO Comprehensive (EU)“ buvo ištirti 437 mėginiai. Iš 208 pacientų, kurių NTRK sintezės rezultatai buvo teigiami, buvo 153 pacientai, kurių mėginiai buvo prieinami ir ištirti „TSO Comprehensive (EU)“, gauti 138 galiojantys ir 15 negaliojančių rezultatų.

„TSO Comprehensive (EU)“ rezultatų atitiktis LT metodų rezultatams, su negaliojančiais „TSO Comprehensive (EU)“ rezultatais ir be jų, parodytas [Lentelė 85](#).

Lentelė 85 NTRK klinikinis susiejimo tyrimas: Suliejimų aptikimo tyrimu „TSO Comprehensive (EU)“ ir LT NTRK metodais atitiktis

Neįskaitant klaidingų „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatų			Įskaitant klaidingus „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatus	
Sutapties matas	% sutaptis (n/N)	95 % PI*	% sutaptis (n/N)	95 % PI*
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 %

* Dvipusis 95 % PI buvo apskaičiuotas naudojant (tiksliai) Clopperio ir Pearsono metodą.

Jautrumo analizė pagal trūkstamus „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatus parodė sutapties analizės patikimumą. Trūkstami LT metodu gauto NTRK suliejimo teigiamo rezultato pacientų „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatai (n = 70) buvo sąlygiškai identifikuoti naudojant logistinės regresijos modelį. Sutapties įvertinimai, įskaitant sąlygiškai priskirtas vertes, pateikti [Lentelė 86](#).

Lentelė 86 NTRK klinikinis susiejimo tyrimas: Tyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ ir LT metodų atitiktis, vertinant NTRK suliejimų aptikimą, įskaitant LT metodu gauto teigiamo rezultatų pacientų, kurių trūksta „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatų, sąlygiškai priskirtas vertes

Sutapties matas	% sutaptis	95 % PI*
PPA	85,2 %	78,6 %–91,7 %

Sutapties matas	% sutaptis	95 % PI*
NPA	96,3 %	93,9 %–98,7 %
OPA	91,2 %	87,9 %–94,5 %

Trūkstanti LT metodu gauto suliejimo neigiamo rezultato pacientų „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatai nebuvo sąlygiškai identifikuoti.

* Dvipusis 95 % PI buvo apskaičiuotas remiantis dauginio sąlyginio identifikavimo Booto metodu. Dauginio sąlyginio identifikavimo Booto metodas yra kartotinės imties veiksmas, įterptas į dauginį sąlyginį identifikavimą (Schomaker and Heumann 2018).

Tyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ ir LT sutaptys pagal metodo tipą (pvz., RNR NGS, FISH) pateiktos [Lentelė 87](#).

Lentelė 87 NTRK klinikinis susiejimo tyrimas: Tyrimo „TSO Comprehensive (EU)“ ir LT metodų atitiktis, vertinant NTRK suliejimų aptikimą, pagal LT metodo tipą

LT metodo tipas	Sutapties matas	% sutaptis (n/N)	95 % PI ¹
DNR 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 %
RNR 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	Neapskaičiuota (1/1)	Neapskaičiuota
	OPA	81,8 % (9/11)	48,2 %–97,7 %
PCR	PPA	100,0 % (8/8)	63,1 %–100,0 %
	NPA	Neapskaičiuota (0/0)	Neapskaičiuota
	OPA	100,0 % (8/8)	63,1 %–100,0 %

Neapskaičiuota – pogrupiams, kurių mėginių skaičius <5, sutarčių statistika nebuvo apskaičiuota.

¹ Dvipusis 95 % PI buvo apskaičiuotas naudojant (tikslų) Clopperio ir Pearsono metodą.

² Apima NGS metodus, kuriuose naudojami tik RNR ir DNR bei RNR.

Iš 437 mėginių, tirtų naudojant „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimą, 24 rezultatai skyrėsi nuo LT: 15 buvo teigiami LT ir neigiami „TSO Comprehensive (EU)“ tyrime, o 9 buvo neigiami LT ir teigiami – „TSO Comprehensive (EU)“ tyrime. Iš 24 mėginių, kurių rezultatai buvo prieštaringi, 8 buvo tiriami DNR NGS LT metodu, 14 – RNR NGS LT metodu ir 2 – FISH.

14 iš 24 mėginių su prieštariniais rezultatais, validuotu nepriklausomu NGS metodu buvo patvirtintas „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimu gautas rezultatas. Likusiems 10 mėginių „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatai nesutapo tiek su LT, tiek su nepriklausomu NGS metodu.

Klinikiniai veiksmingumo rezultatai

ePAS4 kohortoje larotreklinio veiksmingumas pagal „TSO Comprehensive (EU)“ teigiamo, LT teigiamo rezultato populiacijoje (97 pacientai, BAD = 78,4 %, 95 % PI [68,8 %, 86,1 %]) buvo panašus į larotreklinio veiksmingumą bendroje ePAS4 populiacijoje (164 pacientai, BAD = 72,6 %, 95 % PI [65,1 %, 79,2 %]) ([Lentelė 88](#)). Iš 97 pagal „TSO Comprehensive (EU)“ teigiamų ePAS4 pacientų 28 (28,9 %) pacientų pasireiškė visiškas atsakas / visiškas chirurginis atsakas, o 48 (49,5 %) pacientų pasireiškė dalinis atsakas.

Iš 13 pagal „TSO Comprehensive (EU)“ neigiamų, LT teigiamų pacientų vienas (7,7 %) patyrė visišką atsaką, o du (15,4 %) – dalinę atsaką gydant larotrekliniu.

Lentelė 88 NTRK klinikinis susiejimo tyrimas: BAD LT teigiamo rezultato pacientams pagal LT ir „TSO Comprehensive (EU)“ nustatytus ePAS4 rezultatus

		LT suliejimo teigiamas N = 164	„TSO Comprehensive (EU)“ Teigiamas ir LT teigiamas N = 97	„TSO Comprehensive (EU)“ Neigiamas ir LT teigiamas N = 13
Geriausias bendras atsakas, n (%)	Visiškas atsakas	31 (18,9 %)	22 (22,7 %)	1 (7,7 %)
	Chirurginis visiškas atsakas	8 (4,9 %)	6 (6,2 %)	0
	Dalinis atsakas	80 (48,8 %)	48 (49,5 %)	2 (15,4 %)
	Stabili liga	25 (15,2 %)	13 (13,4 %)	4 (30,8 %)
	Progresuojanti liga	13 (7,9 %)	6 (6,2 %)	5 (38,5 %)
	Negalima įvertinti	7 (4,3 %)	2 (2,1 %)	1 (7,7 %)
Bendras atsako dažnis	Pacientų skaičius, n	164	97	13
	Pacientų, patyrusių VA + cVA + DA, skaičius, n	119	76	3
	BAD % (95 % PI*)	72,6 % (65,1 %, 79,2 %)	78,4 % (68,8 %, 86,1 %)	23,1% (5,0 %, 53,8 %)

Santrumpos: VA – visiškas atsakas, DA – dalinis atsakas, cVA = chirurginis visiškas atsakas.

* Dvipusis 95 % pasiklojimo intervalas buvo apskaičiuotas naudojant (tiksliai) Clopperio ir Pearsono metodą.

54 pacientams trūksta „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo rezultatų.

Šio tyrimo duomenys patvirtina „TSO Comprehensive (EU)“ tyrimo saugumą ir veiksmingumą, kai jis naudojamas nustatyti pacientus, sergančius solidiniais navikais su NTRK suliejimais, kurie gali būti tinkami gydyti larotrekliniu.

Literatūra

1. Amerikos klinikinės onkologijos draugija. www.asco.org. Žiūrėta 2016 m. spalio 3 d.
2. Europos medicinos onkologijos draugija. www.esmo.org. Žiūrėta 2016 m. spalio 3 d.

Keitimo istorija

Peržiūra	Data	Keitimo aprašymas
v07	Sausio mėn. 2024	- Pridėta informacija apie procedūros apribojimus: - Nekrotinio audinio ir naviko turinio mėginių reikalavimai MSI didelės apimties ir somatinių skatinamųjų mutacijų nustatymui. - Galimi hemoglobino sukeliama trukdžiai. - RET geno aptikimo ribos ir suliejimas identifikuojant už anotuotų genų ribų. - Apie genų ištrynimą nepranešama. - Atnaujinta naudoti su „TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager“ programinės įrangos versija 2.3.7. - Pridėta informacija prie reikalingos, bet nepateiktos įrangos ir medžiagų, įskaitant dvi papildomas ultragarso garsiakalbio konfigūracijas. - Atnaujinta mėginio ir mėginio informacija: - Nekrotinio audinio turinys. - Proteinazės K ir hemoglobino poveikis. - Skaidrėje esančio FFPE ir išgrynintos nukleino rūgšties laikymas. - Pridėta informacija, siekiant pagerinti reagentų tvarkymą, darbo eigą ir trikčių šalinimą vykdant kokybės kontrolės triktis. - Veiklos charakteristikos papildytos kontekstu ir aiškumu: - Kryžminė tarša - Nukleorūgšties išskyrimo rinkinio įvertinimas - Trukdančiosios medžiagos - Nukleino rūgšties ir skaidrėje esančio FFPE stabilumas - NTRK klinikinis veiksmingumas - Atnaujinta kalba ir gramatika
v06	vasario mėn. 2023	- Papildomas tekstas skyriuje „Apribojimai“ - Teksto atnaujinimai formalumo, gramatikos ir aiškumo reikmėms 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 lentelių pataisymas - Tekstas dėl nuosėdų buvimo FSM reagentė - Atnaujinta šilumokačio ir lovelio specifikacija įrangos ir medžiagų sąraše
v05	2022 m. rugsėjo mėn.	Atnaujintos 2 tyrimo atkuriamumo lentelės
v04	birželio mėn. 2022	- Pridėti „TSO Comprehensive“ analizės modulio v2.3.5 PN - Pašalinti „TSO Comprehensive“ analizės modulio v2.3.3 PN - Atnaujintas skyrius „Tuščios vertės riba“

Peržiūra	Data	Keitimo aprašymas
v03	Balandžio mėn. 2022	• Pridėta veikimo charakteristikų informacija, susijusi su NTRK suliejimais • Pridėta žymė „FOR EXPORT ONLY“ (tik eksportui) • Atnaujintas numatytosios paskirties tekstas, įtraukiant pareiškimą apie NTRK1-3 CDx • Išplėsta gaminio komponentų informacija, įtraukiant programinės įrangos komponentų PN
v02	vasario mėn. 2022	• Ištaisyta lentelės nuorodos klaida • Pridėtas apribojimas, susijęs su gonocitų linijos ir somatiniais variantais • Paaiškintas tekstas apie genų amplifikacijos aptikimą
v01	2021 m. gruodžio mėn.	• Atnaujinti procedūros apribojimai • Paaiškinta magnetinio stovo ir termociklerio specifikacija įrangos ir medžiagų sąrašuose
v00	Lapkričio mėn. 2021 m.	Pirmasis leidimas

Patentai ir prekės ženklai

Šis dokumentas ir jo turinys priklauso „Illumina, Inc.“ ir jos filialams („Illumina“), jis skirtas tik klientui naudoti pagal sutartį, kiek tai susiję su čia aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimu, ir jokių kitų tikslų. Šio dokumento ir jo turinio negalima naudoti ar platinti jokių kitų tikslų ir (arba) kitaip negalima pateikti, atskleisti ar atkurti kokiu nors būdu be išankstinio rašytinio „Illumina“ sutikimo. „Illumina“ šiuo dokumentu neperduoda jokios trečiosios šalies licencijos pagal jos patentą, prekės ženklą, autorių ar kitas teises.

Kvalifikuotas ir tinkamai išmokytas personalas turi griežtai ir aiškiai vadovautis šiame dokumente pateiktomis instrukcijomis, kad būtų užtikrintas tinkamas ir saugus šiame dokumente aprašyto (-ų) produkto (-ų) naudojimas. Prieš naudojant tokį (-ius) produktą (-us), visas šis dokumentas turi būti įdėmiai perskaitytas ir suprastas.

JEI NEBŪS PERSKAITYTOS VISOS ČIA PATEIKTOS INSTRUKCIJOS IR JOMIS NEBŪS VADOVAUJAMASI, GALIMAS PRODUKTO (-Ų) PAŽEIDIMAS, NAUDOTOJO BEI KITŲ ASMENŲ SUŽEIDIMAS IR ŽALA KITAI NUOSAVYBEI, BE TO, TAI PANAIKINA PRODUKTUI (-AMS) TAIKOMOS GARANTIJOS GALIOJIMĄ.

„ILLUMINA“ NEPRISIIMA JOKIOS ATSAKOMYBĖS, JEI ČIA APRAŠOMAS (-I) PRODUKTAS (-AI) (ĮSKAITANT DALIS IR PROGRAMINĘ ĮRANGĄ) NAUDOJAMAS (-I) NETINKAMAI.

© 2024 „Illumina, Inc.“. Visos teisės saugomos.

Visi prekių ženklai priklauso „Illumina, Inc.“ arba jų atitinkamiems savininkams. Daugiau informacijos apie prekių ženklus žr. www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinė informacija



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 JAV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ne Šiaurės Amerikoje)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Gaminio ženklavimas

Visą informaciją apie gaminių pakuočių ir etikečių simbolius rasite simbolių paaiškinimo lentelėje, pateiktoje svetainės support.illumina.com skirtuke „Documentation“ (dokumentacija).