

TruSight Oncology Comprehensive (EU)

illumina®

Príbalový leták

NA POUŽITIE PRI DIAGNOSTIKE IN VITRO. IBA NA EXPORT.

Účel určenia

TruSight Oncology Comprehensive (EU) je diagnostický test *in vitro*, ktorý využíva cielečné sekvenovanie novej generácie na detekciu variantov v 517 génoch využitím nukleových kyselín extrahovaných zo vzoriek tkaniva tumoru fixovaných vo formalíne a zaliatych v parafíne (FFPE) od pacientov s rakovinou s pevnými malígnymi novotvarmi pomocou prístroja Illumina® NextSeq™ 550Dx. Tento test je možné použiť na detekciu variantov s jedným nukleotidom, viacerými nukleotidmi, inzercíí, delécií a amplifikácií génov z DNA, ako aj génových fúzií a variantov zostrihu z RNA. Tento test vykazuje aj skóre mutačnej záťaže tumoru (TMB) a stav mikrosatelitnej nestability (MSI).

Test sa používa ako pomocný diagnostický nástroj na identifikáciu pacientov s rakovinou vhodných na liečbu použitím cielenej terapie ktorú uvádza [Tabuľka 1](#), a to v súlade s označením schváleného terapeutického produktu. Tento test okrem toho poskytuje informácie o profilovaní tumoru slúžiace odbornému zdravotníckemu personálu, ak ho použije v súlade s odbornými pokynmi. Tento test nepredstavuje rozhodný ani inak zaväzujúci nástroj na predpísané použitie akéhokoľvek špecifického liečebného produktu.

Tabuľka 1 Pridružená diagnostická indikácia

Typ tumoru	Biologické markery	Cielená terapia
Pevné tumory	NTRK1, NTRK2 a NTRK3 Fúzie génov	VITRAKVI® (larotrektinib)

Súhrn a vysvetlenie analýzy

Klinický opis

Rakovina je celosvetovo primárnou príčinou úmrtí. Rakovina môže napadnúť akékoľvek tkanivo.¹ Analýza genetickej bázy tumoru je dôležitou pomôckou na identifikáciu pacientov, ktorí môžu využiť výhody cielených terapií, ako aj na vývoj nových spôsobov liečby. Príčinou vzniku alebo súčasťou progresie tumoru je množstvo génov a mnoho tumorov v sebe nesie množstvo variantov ovplyvňujúcich tieto gény a ich funkcie. Tieto varianty môžu zahŕňať mutácie génov, ako napríklad jednonukleotidové varianty (SNV), multinukleotidové varianty (MNV), inzercie alebo delécie, amplifikácie génu, fúzie génov a varianty zostrihu. Ďalším následkom mutácií génov tumoru je prezentácia neoantigénov, ktoré vyvolávajú imunitné reakcie špecifické pre tumor. Stav mutácie tumoru môže byť reprezentovaný TMB (mutačná nálož tumoru) a MSI (mikrosatelitná nestabilita), t. j. genomickými podpismi, ktoré súvisia s prezentáciou neoantigénov tumoru.

Test TruSight Oncology Comprehensive je komplexný genomický profilový (CGP) test sekvenovania novej generácie (NGS), ktorý v rozsiahlej miere vyhodnocuje genomické varianty vo veľkom paneli génov súvisiacich s rakovinou (pozri [Tabuľka 2](#)). Táto analýza deteguje malé varianty v 517 génoch, ako aj amplifikácie génov, fúzie a varianty zostrihu (pozri [Tabuľka 2](#)). Táto analýza poskytuje pokrytie kódovacou sekvenciou pre všetky gény okrem TERT (v tomto prípade je pokrytá iba oblasť promotéra) a hodnotí skóre TMB a stav MSI. Ciele týchto analýz zahŕňajú obsah uvádzaný odbornými organizáciami, ako napríklad Európskou spoločnosťou pre zdravotnícku onkológiu (ESMO), ako aj ďalšími významnými usmerneniami platnými v Spojených štátoch.² Dizajn analýzy TSO Comprehensive je ovplyvnený aj nezávislými publikáciami konzorcia, ako aj farmaceutickým výskumom v následnej fáze.

Zoznam oblastí vylúčených zo stanovenia variantov nájdete v dokumente *Zoznam blokovaných položiek TruSight Oncology Comprehensive (dokument č. 200009524)*, ktorý je uvedený na lokalite podpory spoločnosti Illumina. Zoznam blokovaných položiek je v niektorých súboroch označovaný ako zoznam nepovolených položiek.

[Tabuľka 2](#) obsahuje identifikáciu štyroch kategórií typov variantov: Malý variant DNA (S), amplifikácia génu (A), fúzia (F) a variant zostrihu (splicing) (Sp). Malé varianty DNA zahŕňajú SNV, MNV, inzercie a delécie.

Tabuľka 2 Analytický panel génov TSO Comprehensive (EU)

Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu
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

Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
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

Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
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

Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
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

Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRF1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
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	ZFH3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S

Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu	Č.	ID systému Entrez	Gén	Typ variantu
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa

Zásady postupu

Analýza TSO Comprehensive (EU) je distribuovaný test, ktorý sa vykonáva použitím extrahovanej nukleovej kyseliny ako vstupného materiálu. DNA alebo RNA extrahovaná z tkaniva FFPE sa používa na prípravu knižníc, ktoré sú potom obohatené génmi súvisiacimi s rakovinou a sekvenované v prístroji NextSeq 550Dx.

Analýza TSO Comprehensive (EU) zahŕňa nasledujúce procesy.

- Príprava a obohatenie knižnice – v prípade RNA sa celkovo 40 ng skonvertuje na doplnkovú DNA s dvoma vláknami DNA (cDNA). V prípade genomickej DNA (gDNA) sa 40 ng gDNA štiepi na malé fragmenty. Univerzálne adaptéry na sekvenovanie sa ligujú na fragmenty cDNA a gDNA. Indexovacie sekvencie P5 a P7 sa začlenia do každej knižnice, aby bolo možné zachytiť fragmenty knižnice na povrch prietokového článku počas sekvenovania. Indexy obsahujú jedinečnú sekvenciu na identifikáciu každej jednotlivej vzorky, a v prípade knižníc zo vzoriek gDNA sú v nich obsiahnuté jednotlivé molekuly spolu s jedinečnými molekulárnymi identifikátormi (UMI). Knižnice sa následne obohacujú špecifickými génmi z oblasti záujmu pomocou metódy zachytenia. Sekvencie biotinylovanej sondy, ktoré pokrývajú génové oblasti záujmu, na ktoré cieľ analýza, sa hybridizujú do knižníc. SONDY a hybridizované knižnice, na ktoré cieľ analýza, sa izolujú od knižníc, na ktoré analýza necieľ, streptavidínovými magnetickými časticami. Cieľené obohatené knižnice sa premyjú a amplifikujú. Množstvo každej obohatenej knižnice sa následne normalizuje pomocou guľôčok na zaistenie rovnakého zastúpenia v knižniciach združených na sekvenovanie.
- Sekvenovanie a primárna analýza – normalizované obohatené knižnice sa združia a klastrujú na prietokovom článku, a následne sa sekvenujú technológiou SBS (sequencing by synthesis) v prístroji NextSeq 550Dx. Biochemická technológia SBS pomocou metódy reverzibilného terminátora (koncového činiteľa) deteguje fluorescenčne označené deoxynukleotidové trifosfátové bázy (dNTP) počas ich začleňovania do rastúceho reťazca DNA. Počas každého cyklu sekvenovania sa jedna dNTP báza pridá do reťazca nukleovej kyseliny. dNTP slúži ako terminátor polymerizácie. Po každom začlenení bázy dNTP sa zobrazí fluorescenčné farbivo na identifikáciu danej bázy a potom sa štiepi, aby sa umožnilo začlenenie ďalšieho nukleotidu. Štyri reverzibilné dNTP naviazané na terminátor (A, G, T a C) existujú ako jednotlivé separátne molekuly. Prírodnou konkurenciou sa vo výsledku minimalizuje skreslenie začlenenia. Počas primárnej analýzy sa primárne analýzy báz vykonávajú priamo z meraní intenzity signálu počas každého cyklu sekvenovania. Výsledkom je sekvenovanie po jednotlivých bázach. Ku každej primárnej analýze báz je priradené skóre kvality.
- Sekundárna analýza – analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) sa nachádza v prístroji NextSeq 550Dx ako súčasť softvéru Local Run Manager (LRM) na zjednodušenie nastavenia chodu TSO Comprehensive (EU) a na vykonanie sekundárnej analýzy výsledkov sekvenovania. Sekundárna analýza zahŕňa validáciu spracovania chodu a kontrolu kvality, demultiplexovanie, generovanie súboru FASTQ, zarovnanie a analýzu variantu. Demultiplexovanie oddeľuje údaje zo združených knižníc na základe jedinečných sekvenačných indexov, ktoré boli pridané počas procedúry prípravy knižnice. Vytvorí sa dočasný súbor FASTQ, ktoré obsahujú sekvenačné čítania pre každú vzorku a skóre kvality, a to okrem čítaní zo všetkých klastrov, ktoré neprešli filtrom. Sekvenačné čítania sa následne zarovnávajú s referenčným genómom s cieľom identifikácie vzťahu medzi sekvenciami, a je im priradené skóre na základe oblastí podobnosti. Zarovnané čítania sa zapisujú do súborov vo formáte BAM. Analytický softvér využíva osobitné algoritmy pre knižnice generované zo vzoriek DNA alebo RNA na analýzu malých variantov DNA, amplifikácie génov, TMB a MSI pre vzorky DNA a fúzií a variantov zozrihu

v prípade vzoriek RNA. Moduly analytického softvéru generuje viacero výstupov vrátane metriky sekvenovania a súborov VCF (Variant Call Format, formát stanovenia variantu). Súbor VCF obsahuje informácie o nájdených variantoch na špecifických pozíciách v referenčnom genóme. Pre každú vzorku sú generované metriky sekvenovania a výstupné súbory. Podrobné informácie o sekundárnej a terciárnej analýze nájdete v príručke k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661).

- Terciárna analýza – terciárna analýza, ktorú vykonáva analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU), sa skladá z výpočtov TMB a MSI, pridruženého diagnostického stanovenia, variantov s profilovaním tumoru do dvoch úrovní klinického významu pomocou databázy Knowledge Base (KB) a typu tkaniva, a generovania správy s výsledkami. Profilovanie tumoru je možné označiť aj ako komplexné genomické profilovanie. Súhrn interpretácie výsledkov pre variant, ako aj výsledkov pre biomarker TMB a MSI, je uvedený v správe s výsledkami TSO Comprehensive (EU).

Obmedzenia postupu

Iba na diagnostické použitie *in vitro*.

- Iba na predpis. Tento test sa musí používať v súlade s nariadeniami klinického laboratória.
- Genomické nálezy uvádzané, ktoré uvádza [Tabuľka 2](#), v rámci účelu určenia nie sú rozhodujúce pre stanovené použitie akéhokoľvek špecifického terapeutického produktu.
- V prípade variantov uvádzaných v správe s výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU) v častiach Genomické nálezy s dôkazom klinického významu a Genomické nálezy s potenciálnym klinickým významom sa klinická validácia neuskutočnila.
- Rozhodnutia týkajúce sa starostlivosti o pacienta a liečby pacienta musia vychádzať z nezávislého odborného hodnotenia ošetrojúceho lekára, pričom sa musia zohľadniť všetky dostupné informácie týkajúce sa stavu pacienta, ako napríklad anamnéza pacienta a jeho rodiny, fyzické vyšetrenia, informácie z iných diagnostických testov a preferencie pacienta v súlade so štandardom starostlivosti v danej komunite.
- Kvalita vzorky FFPE je veľmi premenlivá. Vzorky, ktoré neprejdú štandardnými postupmi fixácie, nemusia dodať extrahované nukleové kyseliny, ktoré spĺňajú požiadavky analýzy na kontrolu kvality ([Kontrola kvality na strane 81](#)). Bloky FFPE, ktoré boli skladované dlhšie než päť rokov, vykazovali nižšiu kvalitu.
- Účinnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) vo vzorkách získaných od pacientov s transplantáciou orgánu alebo tkaniva nebola hodnotená.
- V genómoch, v ktorých došlo k výrazným zmenám usporiadania, s deléciami a stratou heterozygotnosti môže softvér TSO Comprehensive (EU) chybné klasifikovať vzorku DNA ako kontaminovanú (CONTAMINATION_SCORE > 3106 a hodnota $p > 0,049$).
- Negatívny výsledok nevylučuje prítomnosť mutácie pod detekčnými limitom (LoD) analýzy.
- Citlivosť detekcie malých variantov DNA môže byť ovplyvnená nasledujúcimi faktormi:
 - genomický obsah s nízkou komplexnosťou,
 - narastajúca dĺžka variantu.

- Skóre TMB môžu byť v nasledujúcich kontextoch nesprávne:
 - ak obsah tumoru dosahuje úroveň, na ktorých konvergujú frekvencie alel zárodočného a somatického variantu (VAF),
 - v populáciách, ktoré nie sú dostatočne zastúpené vo verejných databázach.
- Citlivosť detekcie fúzií môže byť ovplyvnená nasledujúcimi okolnosťami:
 - nízkou komplexnosťou knižnice, výsledkom čoho je nižší podiel podporných čítaní v dôsledku odchýlok od pracovného postupu analýzy (napríklad dodržiavajte kroky miešania v časti [Denaturácia a hybridizácia \(annealing\) RNA na strane 45](#)),
 - keď jeden gén obsiahne obidva body zlomu,
 - v prípadoch, v ktorých sa niekoľko zlomových bodov fúzie nachádza blízko seba s jedným alebo viacerými partnermi, uvedené body zlomu a partneri sa môžu vykazovať ako jeden bod zlomu a partner,
 - malé mediánové veľkosti inzercie – vyžaduje sa minimálna mediánová veľkosť inzercie 80 bp, citlivosť sa však znižuje v rozsahu 80 – 100 bp,
 - malá komplexnosť sekvencie alebo homológny genomický kontext okolo bodov zlomu.
- Rozlíšenie génov zahrnutých do fúzie môže byť ovplyvnené vtedy, keď sa zlomové body fúzie vyskytujú v genomických oblastiach obsahujúcich prekrývajúce sa gény. Analýza bude vykazovať všetky gény oddelené bodkočiarkami v prípade, ak bod zlomu prekrýva viacero génov.
- Nekonzistentné pokrytie v oblasti promotéra TERT môže v dôsledku nízkej hĺbky sekvenovania viesť k nulovému výsledku.
- Anotácia alebo chyby databázy KB môžu spôsobiť výskyt falošne negatívneho alebo falošne pozitívneho výsledku vrátane uvedenia variantu na nesprávnej úrovni (medzi genomickými nálezmi s dôkazom klinického významu a genomickými nálezmi s potenciálnym klinickým významom), alebo môžu byť informácie anotácie v správe nesprávne. Možnosť výskytu chyby má tri zdroje:
 - Anotácia variantu TSO Comprehensive (EU). Miera výskytu chyby je približne 0,0027 %, a to na základe analýzy 2 448 350 variantov z modulu COSMIC v92, čo znamená, že možnosť výskytu chyby je nízka.
 - Chyba databázy KB v dôsledku procesu experimentálnej validácie alebo procesu kategorizácie.
 - Relevantnosť obsahu KB sa v čase mení. Táto správa bude odrážať znalosti v čase zostavovania danej verzie KB.
 - Varianty vykazované v časti Výsledky CDx nie sú ovplyvnené anotáciou ani chybami KB.
- Test TSO Comprehensive (EU) je navrhnutý tak, aby vykazoval somatické varianty pri vykazovaní variantov s dôkazom klinického významu alebo variantov s potenciálnym klinickým významom. Keďže ide o test zameriavajúci sa iba na tumory, vykazovanie zárodočných variantov (zdedených) je možné, ale neúmyselné. Analýza TSO Comprehensive (EU) využíva databázu KB na vykazovanie variantov bez výslovnej anotácie, či ich pôvod spočíva v zárodočných alebo somatických bunkách.
- Databáza KB obsahuje iba terapeutické, diagnostické a prognostické asociácie, ktoré sú relevantné pre varianty v rámci zistenej solídnej zhubnej neoplazmy. Asociácie náchylnosti alebo rizika rakoviny nie sú zahrnuté do databázy KB.

Komponenty produktu

Test TruSight Oncology Comprehensive (EU) sa skladá z nasledujúcich komponentov:

- Súprava TruSight Oncology Comprehensive (EU) (katalógové číslo Illumina 20063092): Súprava obsahuje reagentie s dostatočným objemom na generovanie 24 knižníc DNA a 24 knižníc RNA s kontrolami, ktoré zahŕňajú patientske vzorky a kontroly. Kontroly sa predávajú osobitne (pozri časť [Požadované reagentie, ktoré sa nedodávajú na strane 18](#)).
- Knowledge Base: Pravidelne aktualizovaná, k dispozícii na stiahnutie na portáli Illumina Lighthouse.
- Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (katalógové číslo spoločnosti Illumina 20051843*), ktorý obsahuje nasledujúce komponenty a podporuje používanie funkcií profilovania tumoru a NTRK:
 - Balíky Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.1.0 (číslo produktu 20079589)
 - Softvérový balík TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 (číslo produktu 20079588)
 - Súprava TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 s rozhraním USB (číslo produktu 20079591)
- Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (katalógové číslo spoločnosti Illumina 20051843*), ktorý obsahuje nasledujúce komponenty a podporuje používanie funkcií profilovania tumoru a NTRK:
 - Balíky Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.0.0 (číslo produktu 20051760)
 - Softvérový balík TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 (číslo produktu 20075244)
 - Súprava TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 s rozhraním USB (číslo produktu 20075239)

* Analytický modul Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU): Servisný zástupca spoločnosti Illumina nainštaluje príslušnú verziu analytického modulu TSO Comprehensive (EU) do prístroja Local Run Manager NextSeq 550Dx. Informácie o pracovných postupoch a softvérovej verzii analytického modulu uvádza [Tabuľka 3](#).

Tabuľka 3 Príručka k pracovnému postupu pre softvérovú verziu analytického modulu TSO Comprehensive Analysis

Príručka k pracovnému postupu	Tkanivo	Verzia softvéru TSO Comprehensive
200008661	FFPE	v2.3.5 alebo v2.3.6

Reagencie

Dodávané reagencie

Nasledujúce reagencie sa dodávajú ako súčasť súpravy TSO Comprehensive (EU).

Súprava na prípravu knižnice TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, č. položky 20031127

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota skladovania
First Strand Synthesis Mix (FSM, zmes na syntézu prvého vlákna)	20031431	1	260 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Second Strand Mix (SSM, zmes druhého vlákna)	20031432	1	720 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli, DNA polymerázu, RNázu H a nukleotidy.	-25 °C až -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3, elučná zmes na fragmentáciu priméru)	20031433	1	250 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli a náhodné hexaméry	-25 °C až -15 °C
Reverzná transkriptáza (RVT)	20031434	1	70 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci reverznú transkriptázu	-25 °C až -15 °C

Súprava na prípravu knižnice TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), č. položky 20031118

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota skladovania
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci T4 DNA polymerázu a polynukleotidovú kinázu.	-25 °C až -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1, pufer na ligáciu adaptéra)	20031437	2	1,73 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	-25 °C až -15 °C
DNA Ligase 3 (DNA ligáza 3, LIG3)	20031438	2	190 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci ligázu	-25 °C až -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1, krátke univerzálne adaptéry)	20031439	1	290 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci univerzálne sekvenačné oligonukleotidy.	-25 °C až -15 °C
UMI Adapters v1 (Adaptéry UMI v1, UMI)	20031496	1	290 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci univerzálne sekvenačné oligonukleotidy.	-25 °C až -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL, pufer na zastavenie ligácie)	20031440	2	480 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	-25 °C až -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM, vylepšená PCR zmes)	20031441	2	550 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci DNA polymerázu a nukleotidy	-25 °C až -15 °C

Súprava na prípravu knižnice TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), č. položky 20031119

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota skladovania
Resuspension Buffer (RSB, pufer na opakovanú suspenziu)	20031444	1	12,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	2 °C až 8 °C
Sample Purification Beads (SPB, guľôčky na purifikáciu vzoriek)	20031442	2	6,11 ml	Vodný roztok obsahujúci magnetické guľôčky	2 °C až 8 °C
Pufer TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Roztok Tris EDTA	2 °C až 8 °C

Indexovacie priméry TruSight Oncology Comp UP Index Primers, č. položky 20031120

Aktívne látky: Pufrovaný vodný roztok obsahujúci jednotlivito čiarovými kódmi označené oligonukleotidové priméry.

Poznámka V prípade vzoriek RNA alebo DNA použite jedinečné indexovacie priméry (UPxx).

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

Indexovacie priméry TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Aktívne látky: Pufrovaný vodný roztok obsahujúci jednotlivito čiarovými kódmi označené oligonukleotidové priméry.



UPOZORNENIE

Kombinatorické indexovacie priméry (CPxx) používajte výlučne pre vzorky DNA (pracovný postup FFPE).

Indexovací primér	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Index i7	Sekvencia i7	Index i5	Sekvencia i5	Teplota skladovania
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C

Indexovací primér	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Index i7	Sekvencia	Index i5	Sekvencia	Teplota skladovania
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C až -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C až -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C až -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C až -15 °C

Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), č. položky 20031123

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota skladovania
Pufer Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci formamid a soli	2 °C až 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB, streptavidínové magnetické guľôčky)	20031478	2	7,78 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli a paramagnetické guľôčky v pevnej fáze, ktoré sú kovalentne pokryté streptavidínom	2 °C až 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Roztok hydroxidu sodného	2 °C až 8 °C
Pufer Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Pufrovaný vodný roztok	2 °C až 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1, guľôčky na normalizáciu knižnice)	20031481	1	1,04 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci paramagnetické guľôčky pevnej fázy	2 °C až 8 °C

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota skladovania
Library Normalization Wash 1 (LNW1, premývací roztok na normalizáciu knižnice)	20031482	2	4,8 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli, 2-merkaptoetanol a formamid	2 °C až 8 °C
Pufer Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	2 °C až 8 °C
Resuspension Buffer (RSB, pufer na opakovanú suspenziu)	20031444	1	12,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	2 °C až 8 °C
Sample Purification Beads (SPB, guľôčky na purifikáciu vzoriek)	20031442	2	6,11 ml	Vodný roztok obsahujúci magnetické guľôčky	2 °C až 8 °C

Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), č. položky 20031121

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota skladovania
Target Capture Additives 1 (TCA1, aditíva na zachytenie cieľa)	20031486	2	521 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW, vylepšený premývací roztok na obohatenie)	20031487	1	50,4 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli	-25 °C až -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2, elúcia na obohatenie)	20031488	3	1,65 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci detergent	-25 °C až -15 °C

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota skladovania
Enhanced PCR Mix (EPM, vylepšená PCR zmes)	20031441	2	550 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci DNA polymerázu a nukleotidy	-25 °C až -15 °C
Zmes PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci priméry P5 a P7	-25 °C až -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1, aditíva na normalizáciu knižnice)	20031491	1	4,6 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soli, 2-merkaptotanol a formamid	-25 °C až -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 alebo PhiX, interná kontrolná knižnica)	20031492	1	10 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci genomickú DNA ako knižnicu PhiX	-25 °C až -15 °C

Súprava TruSight Oncology Comp Content Set, č. položky 20031122

Reagencia	Číslo dielu	Množstvo	Objem	Aktívne látky	Teplota skladovania
Zmes Oncology RNA Probe Pool 1 (OPR1)	20031494	1	290 µl	Pool oligonukleotidových sond	-25 °C až -15 °C
Zmes Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Pool oligonukleotidových sond	-25 °C až -15 °C

Požadované reagenty, ktoré sa nedodávajú

Predamplifikačné reagenty

- Reagenty na extrakciu a purifikáciu DNA a RNA – informácie o požiadavkách na reagenty nájdete v časti [Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny na strane 27](#).
- Reagenty na extrakciu a purifikáciu DNA a RNA – informácie o požiadavkách na reagenty nájdete v časti [Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny na strane 27](#).
- TruSight Oncology DNA Control (katalógové číslo Illumina 20065041)
- TruSight Oncology RNA Control (katalógové číslo Illumina 20065042)
- Etanol 100 % (kategória 200), trieda vhodná na molekulárnu mikrobiológiu

- Voda bez obsahu RNázy/DNázy

Reagencie používané po amplifikácii

- Súprava reagencií NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) (katalógové číslo Illumina 20028871)
 - Kazeta s prietokovými článkami NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklov)
 - Kazeta s reagenciami NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov)
 - Kazeta s pufrom NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklov)
- Etanol 100 % (kategória 200), trieda vhodná na molekulárnu mikrobiológiu
- Voda bez obsahu RNázy/DNázy

Skladovanie reagensí a manipulácia s nimi

- Nasledujúce balenia reagensí sa dodávajú zmrazené. Skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C.

Balenie	Číslo dielu	Laboratórna oblasť
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Po amplifikácii
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Po amplifikácii



UPOZORNENIE

Reagencie neuchovávajú v beznámrazovej skladovacej jednotke ani vo dverách chladničky.

- Nasledujúce balenia reagensí sa dodávajú v gélových baleniach na zachovanie teploty v rozsahu od 0 °C do 10 °C. Skladujte pri teplote 2 °C až 8 °C.

Balenie	Číslo dielu	Laboratórna oblasť
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Pred amplifikáciou
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Po amplifikácii



UPOZORNENIE

Reagencie obsahujúce guľôčky (LNB1, SPB a SMB) nezmrazujte.

- Zmeny vo fyzickom vzhľade reagensí môžu naznačovať zhoršenie kvality materiálov. Ak dôjde ku zmenám fyzického vzhľadu (napríklad zmeny farby alebo zakalenie), reagencie nepoužívajte.
- Stabilita analýzy TSO Comprehensive (EU) bola hodnotená a jej účinnosť ostala zachovaná počas štyroch použití súpravy. Reagencie sú stabilné až do dátumu expirácie na štítku balenia, ak sa skladujú pri predpísaných teplotách.

Vybavenie a materiály

Požadované, ale nedodávané vybavenie a materiály

Vybavenie a materiály pred amplifikáciou

Vybavenie	Dodávateľ
Ultrazvukový prístroj so súvisiacim príslušenstvom Prečítajte si časť Optimalizácia ultrazvukových prístrojov na fragmentáciu DNA na strane 25.	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Tepelný cyklovač s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> • Vyhrievané veko s možnosťou nastavenia na 30 °C a 100 °C (alebo s možnosťou vypnutia, ak nie je možné dosiahnuť teplotu 30 °C) • Zahŕňa teplotný rozsah 4 °C až 99 °C • Presnosť teploty ±0,25 °C • Kompatibilný s platničkami PCR s 96 jamkami, 0,2 ml (polypropylén) • Prečítajte si časť Rýchlosť nábehu tepelného cyklovača na strane 26 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Vírivý mixér	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Inkubátory na mikrovzorky (2) s vložkami na platničky MIDI s 96 jamkami (2)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Mikroodstredivka	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Odstredivka (odstredivka na platničky) s nasledujúcimi možnosťami: <ul style="list-style-type: none"> • Odstreďovanie mikroplatničiek s 96 jamkami • Možnosť otáčok 280 × g 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Trepačka platničiek s nasledujúcimi možnosťami: <ul style="list-style-type: none"> • Orbit 2 mm • Možnosť pretrepania s otáčkami 1200 a 1800 ot./min 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Tesniaci klin alebo valček	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Magnetický stojan s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> • Určený na precipitáciu/separáciu paramagnetických guľôčok • Magnety na bočnej strane stojana, nie v jeho dolnej časti • Určený pre platničky MIDI s 96 jamkami 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Vybavenie	Dodávateľ
Presné pipety <ul style="list-style-type: none"> • Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 20 µl • Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 200 µl • Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 1000 µl Spĺňajúce nasledujúce požiadavky: <ul style="list-style-type: none"> • Pravidelne kalibrované, s presnosťou 5 % 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pomôcka pre pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Sérologické pipety s objemom 10 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Adhezívne tesnenia na platničky s 96 jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> • S možnosťou odlepenia, opticky číry polyester • Vhodné pre platničky PCR s obrubou alebo čiastočnou obrubou • Odolné adhezívum, ktoré vydrží viaceré zmeny teploty v rozsahu -40 °C až 110 °C • Bez obsahu DNAázy/RNAázy 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skúmavky do mikroadstredivky, 1,7 ml, bez obsahu nukleázy	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Nádoby na reagentie bez obsahu nukleázy (PVC, jednorazová úzka vanička, 50 ml) (alebo ekvivalent)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 15 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 50 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipetové špičky odolné proti aerosólu, 20 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipetové špičky odolné proti aerosólu, 200 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipetové špičky odolné proti aerosólu, 1000 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skladovacie platničky s 96 jamkami, 0,8 ml (platničky MIDI)	Fisher Scientific, č. položky AB-0859 alebo ekvivalent
Platničky PCR s 96 jamkami, 0,2 ml (polypropylén)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Vybavenie a materiály po amplifikácii

Vybavenie	Dodávateľ
Prístroj NextSeq 550Dx	illumina, katalógové č. 20005715
Odstredivka (odstredivka na platničky) s nasledujúcimi možnosťami: <ul style="list-style-type: none"> Odstreďovanie mikroplatničiek s 96 jamkami Možnosť otáčok 280 × g 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Tepelný cyklovač s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> Vyhrievané veko (100 °C) Zahŕňa teplotný rozsah 4 °C až 99 °C Presnosť teploty ±0,25 °C Kompatibilný s platničkami PCR s 96 jamkami, 0,2 ml (polypropylén) Prečítajte si časť Rýchlosť nábehu tepelného cyklovača na strane 26 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Vírivý mixér	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Inkubátor na mikrovzorky s vložkou na platničky MIDI s 96 jamkami	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Blok vytvárajúci suché teplo s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> Teplotný rozsah 25 °C až 99 °C Presnosť teploty ±5 °C Overte, či sú skúmavky do mikroadstredivky kompatibilné s tepelným blokom 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Trepačka platničiek s nasledujúcimi možnosťami: <ul style="list-style-type: none"> Orbit 2 mm Možnosť pretrepania s otáčkami 1200 a 1800 ot./min 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Mikroadstredivka	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Tesniaci klin alebo valček	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Magnetický stojan s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> Určený na precipitáciu/separáciu paramagnetických guľôčok Magnety na bočnej strane stojana, nie v jeho dolnej časti Určený pre platničky MIDI s 96 jamkami 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Vybavenie	Dodávateľ
Presné pipety <ul style="list-style-type: none"> • Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 20 µl • Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 200 µl • Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 1000 µl Spĺňajúce nasledujúce požiadavky: <ul style="list-style-type: none"> • Pravidelne kalibrované, s presnosťou 5 % 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pomôcka pre pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Sérologické pipety s objemom 10 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Adhezívne tesnenia na platničky s 96 jamkami s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> • S možnosťou odlepenia, opticky číry polyester • Vhodné pre platničky PCR s obrubou alebo čiastočnou obrubou • Odolné adhezívum, ktoré vydrží viaceré zmeny teploty v rozsahu -40 °C až 110 °C • Bez obsahu DNAázy/RNAázy 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skúmavky do mikroadstredivky, bez nukleázy	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Nádoby na reagentie bez obsahu nukleázy (PVC, jednorazová úzka vamička, 50 ml) (alebo ekvivalent)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 15 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 50 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipetové špičky odolné proti aerosólu, 20 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipetové špičky odolné proti aerosólu, 200 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Pipetové špičky odolné proti aerosólu, 1000 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skladovacie platničky s 96 jamkami, 0,8 ml (platničky MIDI)	Fisher Scientific, č. položky AB-0859 alebo ekvivalent
Platničky PCR s 96 jamkami, 0,2 ml (polypropylén)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Optimalizácia ultrazvukových prístrojov na fragmentáciu DNA

Fragmentácia DNA alebo štiepenie ovplyvňuje účinnosť analýzy určením distribúcie veľkosti fragmentov, čo následne ovplyvňuje pokrytie sekvenovania. Bolo hodnotených niekoľko špecifických konfigurácií ultrazvukového spracovania a tieto konfigurácie boli optimalizované pre analýzu TSO Comprehensive (EU) ([Tabuľka 4](#)). Čas štiepenia bol upravený tak, aby bola maximalizovaná metrika MEDIAN_EXON_COVERAGE uvádzaná v časti [Kontrola kvality na strane 81](#). Časy štiepenia (uvádza tučným písmom [Tabuľka 4](#)) sa v rámci jednotlivých konfigurácií odlišovali (rovnako ako výsledky metriky MEDIAN_INSERT_SIZE). Všetky tri konfigurácie boli testované pomocou súpravy 8 skúmaviek – použité objemy uvádza [Tabuľka 4](#).

Optimalizácia konfigurácie 3 (bodová sonda, neodplynená voda, vodný kúpeľ s malým objemom) využívala pulzovanie a vykazovala najkratší čas štiepenia a mierne väčšiu distribúciu veľkosti fragmentov v porovnaní s ďalšími dvoma konfiguráciami (hodnota MEDIAN_INSERT_SIZE bola približne o 5 – 10 bázických párov väčšia). Konfigurácia 3 okrem toho vyžadovala väčší objem vstupnej DNA (50 ng) na dosiahnutie podobnej hodnoty MEDIAN_EXON_COVERAGE vzhľadom na dve ďalšie konfigurácie, v rámci ktorých sa použilo nominálne vstupné množstvo 40 ng. Konfigurácia 3 vykazovala vyššiu mieru poškodenia a denaturácie, a preto zmenšila objem efektívnej hmoty použiteľných molekúl dsDNA na prípravu knižnice.

Počas procesu regenerácie odporúčame odstrediť skúmavky na štiepenie na získanie stanoveného objemu, keďže akákoľvek strata materiálu môže nežiaducim spôsobom ovplyvniť účinnosť.

Tabuľka 4 Hodnotenie cielených konfigurácií ultrazvukového prístroja

Parameter	Konfigurácia		
	1	2	3
Sonda	Línia	Bod	Bod
Objem vodného kúpeľa	5 l	5 l	85 ml
Voda zbavená plynov	Áno	Áno	Nie
Vodný chladič	Áno	Áno	Áno
Teplota vodného kúpeľa	7 °C	7 °C	12 °C
Výkon pri incidente v peaku (PIP)	450 W	175 W	50 W
Činiteľ využitia v %	30	10	30
Počet cyklov na výboj	200	200	1000
Pulzovanie (10-sekundové výboje)	Nie	Nie	Áno
Čas štiepenia	250 s	280 s	200 s*
Spracovanie vzorky	1 – 8	1	1
Veľkosť dávky	1 – 96	1 – 96	1 – 8
Veľkosť vzorky v sklenenej skúmavke s 8 prúžkami	130 µl	130 µl	50 µl
Ekvivalent vstupu DNA (na mediánové pokrytie exónu)	40 ng	40 ng	50 ng

* Čas štiepenia 200 s pozostáva z 10-sekundových výbojov a 20 opakovaní.

Rýchlosť nábehu tepelného cyklovača

Rýchlosť nábehu tepelného cyklovača ovplyvňuje metriky kontroly kvality testu – použiteľné lokality MSI, mediánový binárny počet na cieľ CNV, mediánová veľkosť inzercie (RNA), rovnako ako podporné čítania pre varianty zostrihu a fúzie. Odporúča sa vykonať optimalizáciu rýchlosti nábehu tepelného cyklovača. Napríklad: nastavenie testovaného modelu bolo upravené z predvolenej (a maximálnej) rýchlosti nábehu 5 stupňov C/s na 3 stupne C/s na získanie porovnateľných výsledkov s inými modelmi s nižšími predvolenými rýchlosťami nábehu.

Odber, preprava a skladovanie vzoriek

Počas odberu, prepravy, skladovania a spracovania vzoriek postupujte podľa štandardného postupu.

Požiadavky na vzorky

Tkanivo FFPE

Analýza TSO Comprehensive (EU) vyžaduje 40 ng RNA a 40 ng DNA extrahovanej z tkaniva FFPE. Použitie RNA a DNA umožňuje analyzovať všetky predmetné typy variantu. Tkanivo by malo byť fixované pomocou formalínového fixatíva vhodného na molekulárnu analýzu (napríklad 10 % neutrálny pufovaný formalín). Tkanivo nesmie byť dekalifikované. Než vykonáte analýzu TSO Comprehensive (EU), tkanivovú vzorku je potrebné nechať preskúmať patológom a overiť, či je vzorka na daný test vhodná. Na detekciu niektorých mutácií somatického stimulačného faktora sa vyžaduje minimálny obsah tumoru 20 % (podľa oblasti). Na detekciu výsledkov vysokého podielu MSI sa vyžaduje minimálny obsah tumoru 30 %. Obsah tumoru v prípade amplifikácií génov a variantov RNA závisí od rozsahu amplifikácie alebo expresie fúzie (pozri časť [Obsah tumoru na strane 100](#)).

Na dosiahnutie vysokej pravdepodobnosti extrakcie 40 ng RNA a 40 ng DNA z rôznych pevných typov tkaniva je odporúčaný objem tkaniva $\geq 1,0 \text{ mm}^3$, t. j. ekvivalent kumulatívnej plochy živého (viabilného) tkaniva $\geq 200 \text{ mm}^2$ pri použití sekcií s hrúbkou 5 μm , alebo $\geq 100 \text{ mm}^2$ pri použití sekcií s hrúbkou 10 μm . Kumulatívna plocha tkaniva predstavuje súčet oblasti so živým (viabilným) tkanivom vo všetkých sekciách určených na extrakciu. Napríklad kumulatívnu plochu tkaniva 200 mm^2 možno získať extrakciou štyroch 5 μm sekcií s 50 mm^2 plochou tkaniva na každú sekciu, alebo piatich 10 μm sekcií s plochou tkaniva 20 mm^2 na každú sekciu. Nekróza tkaniva môže znižovať množstvo získanej nukleovej kyseliny. Na minimalizáciu pravdepodobnosti falošných negatívnych výsledkov môže byť tkanivo makrodisekované na dosiahnutie požadovaného obsahu živých (viabilných) buniek tumoru.

Vysoký podiel nekrotického tkaniva ($\geq 25 \%$) môže narúšať schopnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) detegovať amplifikácie génov a fúzie RNA

Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny

- RNA a DNA extrahujte z tkanivových vzoriek FFPE pomocou komerčne dostupných extrakčných súprav. Rozdiely v extrakčných súpravách môžu ovplyvňovať účinnosť. Prečítajte si časť [Hodnotenie súpravy na extrakciu nukleovej kyseliny na strane 91](#).
- Extrahovanú nukleovú kyselinu uchovávajte podľa pokynov od výrobcu extrakčnej súpravy.
- S cieľom vyhnúť sa zmenám koncentrácie v čase odmerajte DNA a RNA bezprostredne pred začiatkom prípravy knižnice. Kvantifikáciu RNA a DNA vykonajte pomocou metódy fluorometrickej kvantifikácie, ktorá využíva farbivá viažuce sa na nukleovú kyselinu. Koncentrácia nukleovej kyseliny by mala byť strednou hodnotou najmenej troch meraní.
- Analýza vyžaduje 40 ng každej vzorky RNA pripravenej vo vode bez obsahu RNázy/DNázy (nedodáva sa), pričom záverečný objem by mal byť 8,5 μl (4,7 ng/ μl).

- Analýza vyžaduje 40 ng každej vzorky gDNA s minimálnou koncentráciou extrakcie 3,33 ng/μl. Štiepenie vyžaduje záverečný objem 52 μl (0,77 ng/μl) s minimálne 40 μl produktu TEB (dodáva sa) použitého ako diluent.

Uchovávanie knižnice

Knižnice uchovávajúte na platničkách PCR s nízkou mierou viazania 7 až 30 dní, a to v závislosti od typu knižnice (pozri [Tabuľka 5](#)).

Tabuľka 5 Doba uchovávania knižnice

Typ knižnice	Platnička	Počet dní	Teplota skladovania
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
Fragmentovaná gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
Pred obohatením	ALS PCR	≤ 30	-25 °C až -15 °C
Po obohatení	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C až -15 °C
PCR po obohatení	PL PCR	≤ 30	-25 °C až -15 °C
Normalizované	NL PCR	≤ 30	-25 °C až -15 °C

Varovania a preventívne opatrenia

Bezpečnosť

1. Niektoré komponenty tejto analýzy obsahujú potenciálne nebezpečné chemikálie. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho plášt'a, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, národnými a miestnymi zákonmi a predpismi. Informácie o kartách bezpečnostných údajov nájdete na stránke support.illumina.com/sds.html.
2. So všetkými vzorkami narábajte tak, ako keby boli infekčné.
3. Použite bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a reagensiami na analýzy noste jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagensiami na analýzy si dôkladne umyte ruky.

Laboratórium

1. Na zabránenie kontaminácii dbajte na dodržanie jednosmerného postupu prác v laboratóriu. Priestory pred amplifikáciou a po amplifikácii musia disponovať špecializovaným vybavením (napr. pipety, špičky pipiet, vírivé mixéry a odstredivka). Na zabránenie prenosu amplifikovaného produktu alebo sondy sa po vstupe do oblasti po amplifikácii nevracajte naspäť do oblasti pred amplifikáciou.
2. Vykonajte kroky indexovacieho PCR a obohatenia v oblasti po amplifikácii, aby nedošlo k prenosu produktu amplifikácie.
3. Postupy prípravy-knižnice vyžadujú prostredie bez obsahu RNázy/DNázy. Pomocou čistiaceho prostriedku na inhibíciu RNázy/DNázy dôkladne dekontaminujte pracovné oblasti. Používajte plastové materiály s certifikáciou nulového obsahu DNázy, RNázy a ľudskej genomickej DNA.
4. Pokiaľ ide o postupy po amplifikácii, pracovné povrchy a vybavenie dôkladne vyčistíte pred každou procedúrou a po nej pomocou čerstvo pripraveného roztoku chlórnanu sodného s koncentráciou 0,5 % (NaOCl). Nechajte roztok na povrchoch pôsobiť 10 minút a potom ho zotrite obrúskom navlhčeným v 70 % roztoku etylalkoholu alebo izopropylalkoholu.
5. Používajte skúmavky, platničky, špičky pipiet a nádoby bez obsahu nukleázy.
6. Počas analýzy používajte kalibrované vybavenie. Dbajte na to, aby ste kalibrovali vybavenie podľa rýchlostí, teplôt a objemov uvádzaných v tomto protokole.
7. Na zaistenie správnosti dávkovania reagensí a vzoriek používajte presné pipety. Kalibráciu vykonávajte pravidelne podľa pokynov výrobcu.
8. Počas používania multikanálových pipiet postupujte podľa nasledujúcich pokynov:
 - Objem pipetovania musí byť najmenej $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Overte, či špičky s bariérou „dobře sedia“ a či sú vhodné z hľadiska značky a modelu multikanálovej pipety.

- Špičky pripevňujte otáčaním a dbajte na to, aby boli všetky riadne nasadené.
 - Aspiráciu vykonávajte pod uhlom 90° a dodržiavajte rovnaké hladiny objemu vo všetkých špičkách.
 - Po aplikácii premiešajte všetky komponenty pipetovaním reakčnej zmesi (nahor/nadol).
 - Po dokončení dávkovania skontrolujte, či bola kvapalina nadávkovaná z každej špičky.
9. Používajte vybavenie stanovené pre danú analýzu a programy nastavujte presne podľa pokynov.
10. Stanovené teploty tepelného cyklovača a inkubátora na mikrovzorky indikujú teplotu reakcie – nemusia indikovať nastavenú teplotu vybavenia.

Analýza

1. Dbajte na to, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii.
 - Keď manipulujete so vzorkami a reagensiami, postupujte podľa vhodných laboratórnych postupov.
 - Pri spracovaní jednotlivých vzoriek a pri dávkovaní nových reagensí používajte zakaždým nový laboratórny spotrebný materiál a nové pipetové špičky.
 - Na obmedzenie rizika krížovej kontaminácie používajte špičky odolné proti aerosólom.
 - Keď sa premiestňujete z oblasti pred amplifikáciou do oblasti po amplifikácii, používajte jednosmerný tok pracovných činností.
 - Naraz vždy otvárajte a manipulujte iba s jedným indexovacím primérom. Ihneď po použití uzavrite každú skúmavku s indexom viečkom. Súprava obsahuje ďalšie viečka.
 - Rukavice si často meňte a vždy v prípade, keď dôjde k ich kontaktu s indexovacími priméromi alebo vzorkami.
 - Nepoužité skúmavky s indexovacími priméromi odstráňte z pracovnej oblasti.
 - Nevracajte reagenty do skladovacích skúmaviek po ich použití v skúmavke s prúžkami, úzkej vaničke alebo zásobníku.
 - Vzorky premiešajte pipetou a podľa indikácie odstredte platničku.
 - Používajte trepačku na mikroplatničky. Platničky nemiešajte vírivým spôsobom.
2. Dbajte na to, aby nedošlo k zámene komponentov analýzy z odlišných šarží súprav reagensí. Šarže súprav reagensí sú označené na štítku balenia súpravy reagensí a v informačnom hárku k šarži.
3. Vyžaduje sa dodržiavanie správnych laboratórnych postupov, aby nedošlo ku kontaminácii reagensí, prístrojov, vzoriek a knižníc nukleázami a produktmi PCR. Kontaminácia spôsobená nukleázou a produktom PCR môže zapríčiniť nepresné a nespoľahlivé výsledky.
4. Na dosiahnutie optimálnej účinnosti analýzy a jej uchovávanie sa vyžaduje správny typ platničky. Dodržiavajte pokyny na prenos platničky, ktoré opisuje [Návod na použitie na strane 40](#).
5. Nedodržiavanie uvádzaných postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo významnému zníženiu kvality knižnice.
6. Ak [Návod na použitie na strane 40](#) neuvádza bod bezpečného zastavenia, ihneď pokračujte ďalším krokom.

7. Analytické reagenty alebo komponenty uchovávajte pri stanovenej teplote v určených predamplifikačných a poamplifikačných oblastiach.
8. Reagenty neuchovávajte v beznámrazovej skladovacej jednotke ani vo dverách chladničky.
9. Reagenty obsahujúce guľôčky (LNB1, SPB a SMB) nezmrazujte.
10. Nepoužívajte nesprávne uchovávané reagenty.
11. Presne dodržiavajte pokyny na miešanie a manipuláciu uvádzané pre každú reagentiu. Nedostatočné miešanie alebo nadmerné miešanie môže viesť k nesprávnym výsledkom vzoriek.
12. Pripravte si čerstvé hlavné zmesi (master mix) a použítí zvyšný obsah zlikvidujte.
13. Vždy si pripravte čerstvý 80 % roztok etanolu s vodou bez obsahu RNázy/DNázy na premývanie. Etanol dokáže absorbovať vodu zo vzduchu, čo môže ovplyvňovať výsledky. V súlade s miestnymi, štátnymi alebo federálnymi nariadeniami zlikvidujte 80 % roztok etanolu po použití.
14. Prenášajte stanovený objem eluátu. Prenos menšieho než stanoveného objemu eluátu počas elúcie môže ovplyvňovať výsledky.
15. Postupujte podľa nasledujúcich pokynov týkajúcich sa ultrazvukových prístrojov. Dodržiavajte pokyny výrobcu.
 - gDNA naplňajte do skúmavky určenej do ultrazvukového prístroja pomaly, aby nedochádzalo k tvorbe bublín. Nadmerný podiel bublín alebo vzduchová medzera v skúmavke na štiepenie môže viesť k neúplnej fragmentácii.
 - Dávkovanie do skúmaviek ultrazvukového prístroja vykonávajte pomaly a dbajte na to, aby nedochádzalo k rozstreknutiu.
 - S cieľom vyhnúť sa vytlačeniu kvapaliny a strate vzorky nezasúvajte špičku pipety do spodnej časti skúmavky určenej do ultrazvukového prístroja počas odoberania fragmentovanej DNA.
16. Nepipetujte menej než 2 µl vstupu vzorky.
17. Nepoužívajte úzku vaničku na dávkovanie reagentov v krokoch, ktoré vyžadujú prídanie menej než 10 µl materiálu do každej jamky na vzorku.
18. Používajte pipetu P20 počas prenosu vzorky fragmentovanej gDNA zo skúmaviek ultrazvukového prístroja na platničku prípravy knižnice (LP).
19. Nekombinujte dovedna adaptéry UMI a SUA1.
20. Adaptéry SUA1 použite v prípade vzoriek RNA.
21. Adaptéry UMI použite v prípade vzoriek DNA.
22. Priradte odlišné indexovacie priméry ku každej vzorke knižnice na jedinečnú identifikáciu každej knižnice v prípade jej združovania na sekvenovanie v jednom prietokovom článku.
23. Nekombinujte dovedna indexovacie priméry CPxx a UPxx v rovnakej knižnici.
24. Nesúlad medzi vzorkami a indexovacími primérami môže spôsobiť vykazanie nesprávneho výsledku v dôsledku toho, že sa nepodarí pozitívne identifikovať vzorku. Než začnete s prípravou knižnice, zadajte ID vzoriek a priradte indexy v analytickom module Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Počas prípravy knižnice si zaznamenajte ID vzorky, indexy a orientáciu jamiek na platničke.
25. V prípade knižníc odvodených zo vzoriek RNA používajte iba indexy UPxx.
26. V prípade knižníc odvodených zo vzoriek DNA používajte indexy UPxx alebo CPxx.

27. Sekvenujte 8 knižníc RNA a 8 knižníc DNA na jeden prietokový článok. Prečítajte si časť *Počet knižníc a výber indexov na strane 37*.
28. Sekvenujte minimálne tri knižnice. Postupujte podľa pokynov v časti *Počet knižníc a výber indexov na strane 37*.
29. Po dokončení kroku viazania v častiach *Prvé zachytenie cieľov na strane 61* a *Druhé zachytenie cieľov na strane 65* pokračujte ihneď krokom premývania na zabránenie vysušeniu guľôčkových peliet.
30. Počas krokov premývania dbajte na to, aby ste odstránili všetok 80 % roztok etanolu z dolnej časti jamiiek. Zvyškový etanol môže ovplyvniť výsledky.
31. Na dosiahnutie optimálnej účinnosti analýzy dodržiavajte počet premytí uvádzaný v dokumente *Návod na použitie na strane 40*
32. Počas procedúry *Normalizácia knižníc na strane 71* dôkladne resuspendujte guľôčkovú peletu knižnice na dosiahnutie konzistentnej hustoty klastra na prietokovom článku.

Poznámky k postupu

- Pracovný postup analýzy TSO Comprehensive (EU) je možné realizovať podľa nasledujúceho harmonogramu.
 - Deň 1: syntéza cDNA zo vzoriek RNA, DNA fragmentácia vzoriek gDNA, príprava knižnice a spustenie nočnej (prvej) hybridizácie.
 - Deň 2: Obohatenie, normalizácia obohatených knižníc a načítanie knižníc do prístroja NextSeq 550Dx.Ak nie je možné realizovať pracovný postup analýzy TSO Comprehensive (EU) podľa tohto harmonogramu, v rámci protokolu je stanovených niekoľko bodov bezpečného zastavenia. Ak sa v protokole neurčí bod bezpečného zastavenia, ihneď prejdite na ďalší krok.
- Knižnice odvodené zo vzoriek RNA a DNA je možné pripraviť súbežne v osobitných jamkách.
- Tabuľky opisujúce prípravu hlavnej zmesi zahŕňajú objemový prebytok na zaistenie dostatočného množstva vzhľadom na počet spracúvaných vzoriek.
- Používajte vodu triedy určenej pre molekulárnu biológiu bez obsahu nukleáz.
- Po pridaní reagentie vypláchnite špičku jednou aspiráciou a nadávkovaním do príslušnej jamky na platničke (ak nie je stanovené v procedúre inak).
- Izbová teplota je stanovená na 15 °C až 30 °C.

Programy tepelného cyklovača

- Pred spustením protokolu naprogramujte programy tepelného cyklovača na predamplifikačné a postamplifikačné vybavenie.
- Overte, či platničky PCR riadne v tepelnom cyklovači „sedia“.
- Používajte platničky odporúčané výrobcom tepelného cyklovača.

Utesnenie a otvorenie platničky

- Platničky vždy utesňujte novým adhezívnym tesniacim pokrytím. Tesnenia opakovane nepoužívajte.
- Ak chcete utesniť platničku, pomocou tesniaceho klina alebo valčeka riadne upevnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku.
- Platničku s 96 jamkami vždy utesnite novým adhezívnym tesniacim pokrytím pred vykonaním ďalších krokov protokolu.
 - Kroky pretrepania platničky
 - Kroky odstreďovania
 - Kroky tepelného cyklovania
 - Hybridizácie
 - Dlhodobé skladovanie

- Na obmedzenie rizika krížovej kontaminácie a odparovania overte, či sú okraje a jamky riadne utesnené.
- Než začnete pomaly odstraňovať tesnenie, položte platničku na rovný povrch.
- Ak pred jej odkrytím spozorujete kvapalinu alebo kondenzáciu na tesnení alebo bočných stenách jamiek platničky, vykonajte odstredenie s otáčkami 280 x g 1 minútu.
- Používajte adhezívne tesniace pokrytia, ktoré si zachovávajú funkčnosť pri teplotách -40 °C až 110 °C, a sú vhodné pre platničky s obrubou alebo polovičnou obrubou.

Vybavenie

- Dbajte na to, aby laboratórny personál poznal pokyny výrobcu na používanie a údržbu všetkého vybavenia pred tým, než začne s analýzou.

Typ platničky a prenosi medzi platničkami

- Na dosiahnutie optimálnej účinnosti analýzy a jej uchovávanie sa vyžaduje správny typ platničky.
- Keď prenášate objemy medzi platničkami, stanovený objem preneste z každej jamky platničky do príslušnej jamky na cieľovej platničke.
- Počas prenosov vzoriek medzi súpravami skúmaviek alebo platničkami je možné použiť multikanálové pipety.
- Počas pretrepávania platničiek postupujte podľa nasledujúcich pokynov.
 - Na pretrepanie platničky použite trepačku na platničky. Platničky nemiešajte vírivým spôsobom.
 - Platničky PCR pretrepávajte s otáčkami 1200 ot./min.
 - Platničky MIDI pretrepávajte s otáčkami 1800 ot./min.
 - Podľa pokynov od výrobcu zaistite, aby trepačka na platničky riadne „držala“ platničku.

Odstredovanie

- Keď pokyny v protokole indikujú krátke odstredovanie, odstredujte s otáčkami 280 x g 1 minútu.
- Ak na tesnení alebo na stranách jamiek spozorujete kvapalinu, odstredujte platničku s otáčkami 280 x g 1 minútu.

Manipulácia s reagentami

- Všetky skúmavky s reagentami po použití riadne uzavrite, aby ste obmedzili odparovanie a zabránili kontaminácii.
- Keď reagentie nebudete viac v rámci procedúry potrebovať, vráťte ich na miesto uchovávania so stanovenou teplotou.
- Postupujte podľa pokynov na prípravu reagentov, ktoré sú uvedené pred každou procedurálnou časťou dokumentu [Návod na použitie na strane 40](#).
- Pripravte si požadovaný objem hlavnej zmesi, elučnej zmesi a 80 % etanolu vzhľadom na počet spracúvaných vzoriek.

- Objemy uvádzané v tabuľkách hlavnej zmesi a roztokov obsahujú nadmerný objem. Výpočty nadmerného objemu sú tieto.
 - Tabuľka 14**
 - Objem FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{počet vzoriek} + \text{kontrol}) \times (1,25)$.
 - Objem RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{počet vzoriek} + \text{kontrol}) \times (1,25)$.
 - Tabuľka 21**
 - Objem ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,20)$.
 - Objem ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,20)$.
 - Tabuľka 29**
 - Objem EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,364)$.
 - Objem HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,364)$.
 - Tabuľka 30**
 - Objem EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,364)$.
 - Objem HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,364)$.
 - Tabuľka 36**
 - Objem LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (2,0)$.
 - Objem LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (2,0)$.
 - Tabuľka 37**
 - Objem EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,25)$.
 - Objem HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{počet knižníc}) \times (1,25)$.

Súpravy adaptérov

- Analýza TSO Comprehensive (EU) zahŕňa adaptéry SUA1 a UMI.
- Adaptéry SUA1 sú určené na použitie so vzorkami RNA (nie DNA).
- Adaptéry UMI sú určené na použitie so vzorkami DNA (nie RNA).

Manipulácia s guľôčkami

- Analýza TSO Comprehensive (EU) obsahuje tri typy guľôčok (SPB, SMB a LNB1). Dbajte na to, aby ste počas procedúry použili správny typ guľôčok.
- Vykonajte správny počet premytí pri každom type guľôčok.
- Dbajte na to, aby guľôčky pred použitím nadobudli izbovú teplotu.
- Na zaistenie homogenity miešajte guľôčky 1 minútu pred použitím.
- Keď miešajte guľôčky pomocou pipety, postupujte podľa nasledujúcich pokynov.

- Používajte vhodnú pipetu a veľkosť špičky vzhľadom na objem, ktorý miešate.
- Upravte nastavenie objemu na približne 50 – 75 % objemu vzorky.
- Pipetujte pomaly bez uvoľnenia piesta.
- Dbajte na to, aby nedošlo k rozstreknutiu a vytvoreniu bubliniek.
- Nastavte špičku pipety nad peletu a dávajte priamo do pelety na uvoľnenie guľôčok z jamky alebo skúmavky.
- Dbajte na to, aby sa guľôčková peleta nachádzala úplne celá v roztoku. Roztok by mal mať tmavohnedú farbu a homogénnu konzistenciu.
- Overte, či guľôčková peleta existuje (je prítomná). Opatrne aspirujte celý roztok guľôčok v jamke do špičky a skontrolujte spodnú časť jamiek.
- Ak aspirujete guľôčky do špičiek pipety počas krokov magnetickej separácie, nadávajte guľôčky naspäť do jamky na platničke na magnetickom stojane. Počkajte, kým nebude kvapalina číra (približne 2 minúty) a potom pokračujte ďalším krokom procedúry.
- Keď premývate guľôčky:
 - Používajte odporúčaný magnetický stojan na platničku.
 - Kvapalinu dávajte priamo na guľôčkovú peletu tak, aby boli guľôčky na bočnej strane jamiek vlhké.
 - Ponechajte platničku na magnetickom stojane dovtedy, kým sa v procedúre neuvádza, že ju máte odobrať.
 - Platničku na magnetickom stojane nemiešajte.
 - Kým je platnička na magnetickom stojane, snažte sa guľôčkovú peletu žiadnym spôsobom nenarúšať.
- Keď premývate guľôčky alebo odstraňujete supernatant, nakloňte špičky pipety v dolnej časti jamiek tak, aby ste nevytvárali podtlak a nenasali roztok do filtrov v pipetovej špičke.

Formulár sledovania laboratórnych postupov

- Formulár *TruSight Oncology Comprehensive (EU) Lab Tracking Form* (dokument č. 200009022) obsahuje kontrolný zoznam krokov protokolu.

Počet knižníc a výber indexov

Pred nastavením chodu naplánujte počet knižníc zo vzorky a indexov vzoriek pre chod sekvenovania. Nasledujúce pokyny týkajúce sa počtu vzoriek zahŕňajú pozitívne kontroly, nie však negatívne kontroly ani kontroly bez templátu (NTC). Kontroly NTC je potrebné pridať do naplánovaného chodu ako ďalšiu vzorku.

V prípade analýzy TSO Comprehensive (EU) pri určovaní počtu knižníc na sekvenovanie na jednom prietokovom článku postupujte podľa pokynov, ktoré uvádza [Tabuľka 6](#) a [Tabuľka 7](#).

Tabuľka 6 Knižnice RNA alebo DNA na analýzu TSO Comprehensive (EU)

Typ knižnice	Minimum*	Maximum
RNA	3	16
DNA	3	8

Na dosiahnutie optimálneho využitia reagensov počas sekvenovania pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) v prístroji NextSeq 550Dx sekvenujte 8 knižníc RNA a 8 knižníc DNA na prietokový článok.

Tabuľka 7 Kombinácia knižníc RNA a DNA na analýzu TSO Comprehensive (EU)

Počet knižníc DNA	Počet knižníc RNA
8	8

Počas prípravy knižnice pridajte do každej knižnice vzoriek indexovací primér. *V každej knižnici vzoriek použite odlišnú zmes indexovacieho priméru.* Indexovacie priméry jedinečne identifikujú každú vzorku, vďaka čomu je možné knižnice združiť na účely sekvenovania na jednom prietokovom článku. (Kompatibilné kombinácie indexov sa zobrazia na obrazovke Create Run (Vytvorenie chodu) počas nastavovania chodu v analytickom module Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU).)

Dbajte na to, aby sa indexovacie priméry, ktoré používate so vzorkami, zhodovali s indexmi, ktoré vyberiete na analýzu pomocou analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). *Nesúlad môže spôsobiť vykazovanie nesprávneho výsledku v dôsledku toho, že sa nepodarí pozitívne identifikovať vzorku.*

Test TSO Comprehensive (EU) obsahuje dva typy indexov.

- Indexy UPxx – indexy UPxx sa používajú pre knižnice vytvorené zo vzoriek RNA alebo DNA.
- Indexy CPxx – indexy CPxx sa používajú pre knižnice vytvorené zo vzoriek DNA. Nepoužívajte indexy CPxx v prípade knižníc vytvorených z RNA alebo vtedy, keď sekvenujete celkom tri knižnice DNA.

Keď sekvenujete iba tri knižnice, vyžaduje sa nasledovné:

- Knižnice musia byť typu „všetky DNA“ alebo „všetky RNA“.
- Nepoužívajte súpravy indexov CPxx.
- Na zabezpečenie požadovanej diverzity sa vyžaduje niektorá z nasledujúcich súprav indexov.

- UP01, UP02 a UP03
- UP04, UP05 a UP06
- UP07, UP08 a UP09
- UP10, UP11 a UP12

Prvej knižnici je napríklad priradená hodnota UP01, druhej knižnici hodnota UP02 a tretej knižnici UP03.

Kontroly TruSight Oncology

Súprava TSO Comprehensive (EU) vyžaduje použitie kontrol TruSight Oncology, t. j. kontroly DNA TruSight Oncology a kontroly RNA TruSight Oncology, ako pozitívnych kontrol. Zahrňte kontrolu DNA TruSight Oncology do každého chodu sekvenovania DNA a kontrolu RNA TruSight Oncology do každého chodu sekvenovania RNA v rámci udalosti prípravy danej knižnice (zahrňte aj kontroly pre kombinované chody DNA a RNA). Ku každému plánovanému chodu sekvenovania je pripravená jedinečná pozitívna kontrola.

Zahrňte jednu kontrolu NTC do každej udalosti prípravy knižnice RNA a DNA. Kontrola NTC sa opakovane sekvenuje v rámci jednej udalosti prípravy knižnice. Postupujte podľa nasledujúcich pokynov pre kontroly TruSight Oncology:

- Pripravte si knižnice z pozitívnych kontrol a kontrol bez templátu identicky ako vzorky.
- Použite TEB pre DNA NTC.
- Použite vodu bez obsahu DNAázy/RNAázy pre kontrolu RNA NTC.
- Pozitívne kontroly sú zahrnuté do maximálnej požiadavky na knižnicu.
- Kontroly NTC nie sú zahrnuté do minimálnej požiadavky na knižnicu.
- Počas sekvenovania 3 knižníc použite indexy typu UP pre kontrolu NTC.
- Keďže kontrola NTC sa sekvenuje opakovane, indexy vybrané pre túto kontrolu nie je možné opakovať v udalosti prípravy knižnice.

Nasledujúce tabuľky uvádzajú vzorové rozloženia platničiek na prípravu knižnice. Každý očíslovaný stĺpec predstavuje jeden chod sekvenovania. V prípade spoločného sekvenovania knižníc DNA a RNA predstavuje každá príslušná skupina stĺpcov jeden chod sekvenovania (napríklad stĺpce 1 a 7). Kontrola NTC je sekvenovaná pre každý stĺpec alebo súbor stĺpcov.

Tabuľka 8 Udalosť prípravy knižnice pozostávajúca z jedného chodu (šesť patientskych vzoriek)

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pozitívna kontrola DNA	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	Pozitívna kontrola RNA
B	DNA 1	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 1
C	DNA 2	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 2
D	DNA 3	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 3
E	DNA 4	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 4
F	DNA 5	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 5
G	DNA 6	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA 6
H	DNA NTC	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	prázdne	RNA NTC

Tabuľka 9 Udalosť prípravy knižnice pozostávajúca z troch chodov (20 patientskych vzoriek)

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

Návod na použitie

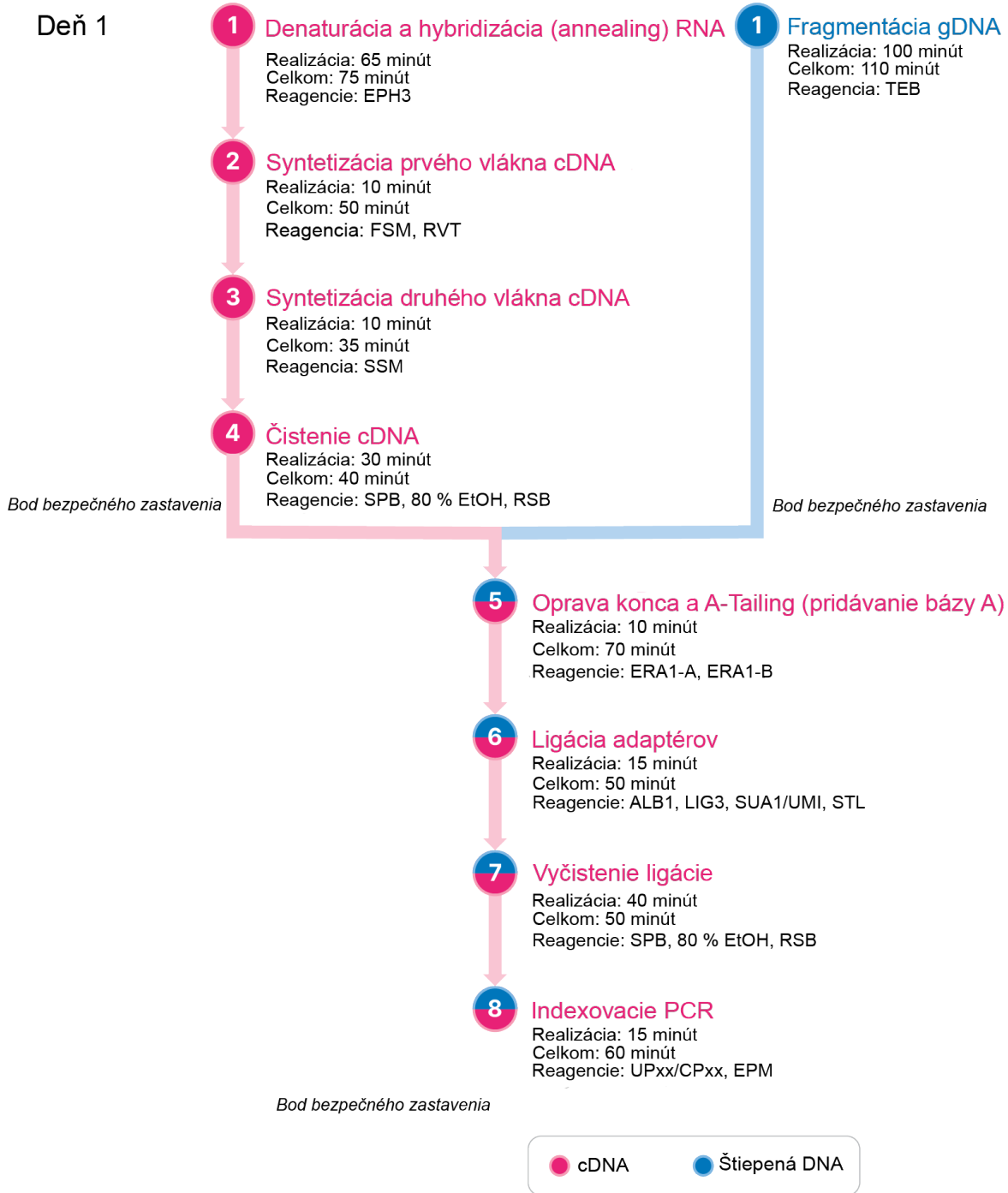
Prehľad pracovného postupu testu TSO Comprehensive (EU) opisuje [Obrázok 1](#) a [Obrázok 2](#).

Postup práce pri príprave knižnice

[Obrázok 1](#) uvádza pracovný postup prípravy knižnice na analýzu TSO Comprehensive (EU). Knižnice zo vzoriek RNA a DNA je možné pripraviť súbežne v osobitných jamkách. Pozitívne kontroly a kontroly bez templátu sa spracujú identicky ako vzorky. Medzi jednotlivými krokmi sú vyznačené body bezpečného zastavenia.

Než spustíte protokol, prečítajte si informácie o chode a vzorkách v hárku s údajmi na analýzu v2, ktoré sa používajú v rámci analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Prečítajte si príručku k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661).

Obrázok 1 Pracovný postup analýzy TSO Comprehensive (EU) (časť 1)

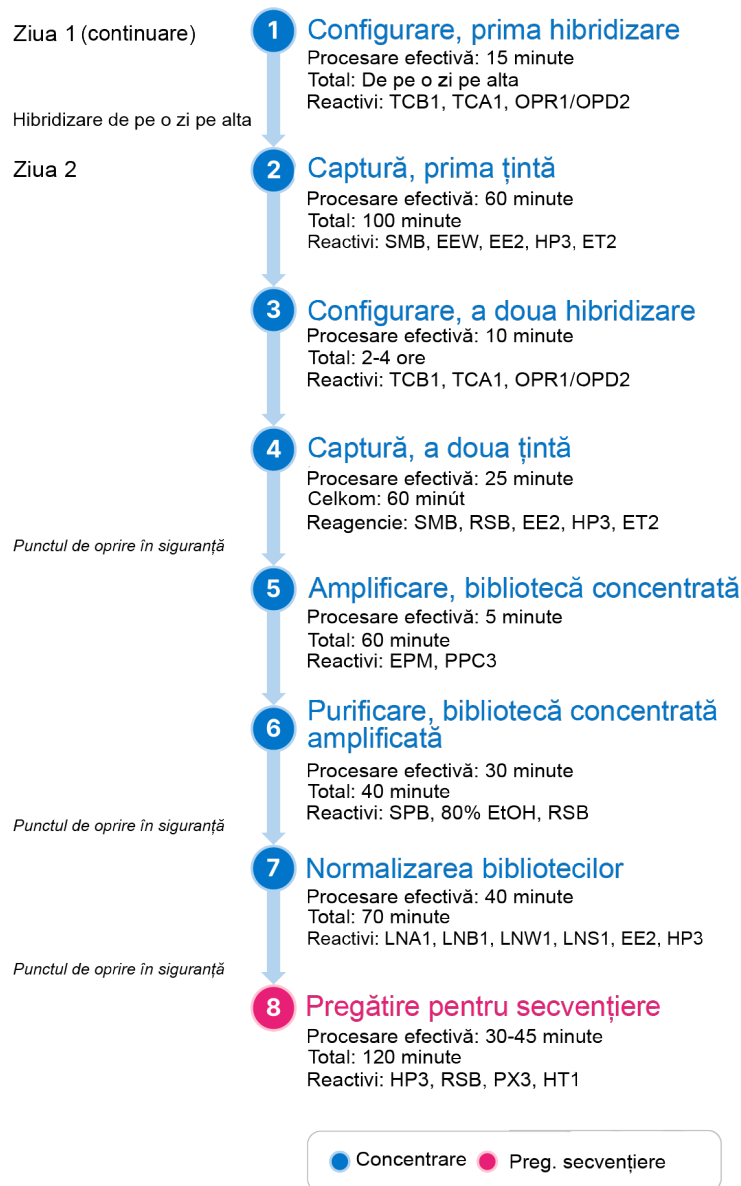


* Čas realizácie a celkový čas predstavujú odhady.

Pracovný postup obohatenia

Obrázok 2 uvádza pracovný postup obohatenia na analýzu TSO Comprehensive (EU). Medzi jednotlivými krokmi sú vyznačené body bezpečného zastavenia.

Obrázok 2 Pracovný postup analýzy TSO Comprehensive (EU) (časť 2)



Programovanie tepelného cyklovača

Než začnete s analýzou, uložte nasledujúce programy v predamplifikačných a postamplifikačných tepelných cyklovačoch.

Tabuľka 10 Programy predamplifikačného tepelného cyklovača

Krok procedúry	Názov programu	Teplota veka	Reakčný objem	Parametre tepelného cyklovača
Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C, 5 minút • 4 °C, 1 minúta • 4 °C, podržanie
Syntetizácia prvého vlákna cDNA	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C, 10 minút • 42 °C, 15 minút • 70 °C, 15 minút • 4 °C, 1 minúta • 4 °C, podržanie
Syntetizácia druhého vlákna cDNA	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C, 25 minút • 4 °C, 1 minúta • 4 °C, podržanie

POZNÁMKA Ak nie je možné nastaviť teplotu veka pri kroku 2ndSS na 30 °C, vypnite možnosť prípravného ohrievania veka.

Tabuľka 11 Programy postamplifikačného tepelného cyklovača

Krok procedúry	Názov programu	Teplota veka	Reakčný objem	Parametre tepelného cyklovača
Indexovacie PCR	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C, 30 sekúnd • 15 cyklov: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C, 10 sekúnd • 60 °C, 30 sekúnd • 72 °C, 30 sekúnd • 72 °C, 5 minút • 10 °C, podržanie
Vykonanie prvej hybridizácie	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C, 10 minút • 85 °C, 2 min. 30 sekúnd • 75 °C, 2 min. 30 sekúnd • 65 °C, 2 min. 30 sekúnd • 57 °C, podržanie 8 až 24 hodiny

Krok procedúry	Názov programu	Teplota veka	Reakčný objem	Parametre tepelného cyklovača
Vykonanie druhej hybridizácie	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C, 10 minút • 85 °C, 2 min. 30 sekúnd • 75 °C, 2 min. 30 sekúnd • 65 °C, 2 min. 30 sekúnd • 57 °C, podržanie 1,5 až 4 hodiny
Amplifikácia obohatenej knižnice	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C, 30 sekúnd • 18 cyklov: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C, 10 sekúnd • 60 °C, 30 sekúnd • 72 °C, 30 sekúnd • 72 °C, 5 min • 10 °C, podržanie

Príprava na kroky protokolu

1. Pomocou čistiaceho prostriedku na inhibíciu RNázy/DNázy dôkladne dekontaminujte pracovné oblasti.



UPOZORNENIE

Všetky procedúry v rámci pracovného postupu vyžadujú použitie prostredia bez obsahu RNázy/DNázy.

2. Nastavte predamplifikačné programy tepelného cyklovača. Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).
3. Na nastavenie ultrazvukového zariadenia postupujte podľa pokynov výrobcu.
4. Ak spracúvate iba vzorky DNA, pokračujte priamo časťou [Fragmentácia gDNA na strane 49](#).
5. Vytiahnite kontroly RNA z miesta uloženia.
6. Vytiahnite skúmavky s reagensiami z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 12 Súprava TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (č. položky 20031127)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
EPH3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu	Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA
FSM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu	Syntetizácia prvého vlákna cDNA
RVT	-25 °C až -15 °C	Uchovávajte na ľade	Syntetizácia prvého vlákna cDNA
SSM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu	Syntetizácia druhého vlákna cDNA

Tabuľka 13 Súprava TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (č. položky 20031119)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SPB (svetlozelený štítok)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Čistenie cDNA
RSB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Čistenie cDNA

Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA

Tento proces denaturuje purifikovanú RNA a počas prípravy na syntézu cDNA do nej vkladá náhodné hexamérové priméry.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - EPH3 – odložte nabok.
 - FSM – vírením premiešajte. Krátko odstred'ite a pipetovaním premiešajte. Reagencia môže obsahovať biele produktové pevné častice. Nevyžaduje sa žiadna akcia používateľa. Nemá to vplyv na účinnosť produktu.
 - RVT – krátko odstred'ite a pipetovaním premiešajte. Uchovávajte na ľade.

POZNÁMKA RVT je viskózný roztok. Počas pipetovania sa snažte minimalizovať tvorbu bublín.

2. Do skúmavky do mikroadstredivky prenesť nasledujúce objemy na prípravu zmesi FSM + RVT Master Mix.

Tabuľka 14 Zmes FSM + RVT Master Mix

Súčasť zmesi Master Mix	4 knižnice (µl)	8 knižníc (µl)	16 knižnice (µl)	24 knižníc (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagentami na strane 34](#).

3. 10-násobným pipetovaním premiešajte.
4. Uložte zmes FSM + RVT Master Mix na ľad až do kroku [Syntetizácia prvého vlákna cDNA na strane 46](#).

Postup

1. Rozmrázte extrahované vzorky RNA a kontroly RNA, ktoré sú na ľade. Kontroly RNA spracujte ako vzorky v rámci zvyšnej časti protokolu.
2. Keď vzorky RNA nepoužívate, uchovávajte ich na ľade. Informácie o kvantifikácii vzoriek nájdete v časti [Požiadavky na vzorky na strane 27](#).
3. 10-násobným pipetovaním každej vzorky RNA vzorky premiešajte.

4. Použite vodu bez obsahu RNázy/DNázy na prípravu 40 ng každej vzorky RNA s celkovým objemom 8,5 µl (4,7 ng/µl).
V prípade kontrol RNA použite koncentráciu uvedenú na štítku skúmavky.
5. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako CF (fragmenty cDNA).
6. Pridajte 8,5 µl každej vzorky RNA do jedinečnej jamky na platničke CF PCR.
7. Dbajte na to, aby sa indexy a rozloženie pre každú vzorku zhodovali s chodom naplánovaným v analytickom module TSO Comprehensive (EU) počas nastavovania chodu.
8. Vírením premiešajte EPH3 a potom krátko odstredte.
9. Do každej jamky na vzorku pridajte 8,5 µl EPH3.
10. Na platničku CF PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.



UPOZORNENIE

Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.

11. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 1 minútu.
12. Odstredujte pri otáčkach 280 × g 1 minútu.
13. Vložte do tepelného cyklovača a spustite program LQ-RNA.
Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).
14. Keď vzorky dosiahnu 4 °C, počkajte jednu minútu a potom ihneď pokračujte ďalším krokom.

Syntetizácia prvého vlákna cDNA

Tento proces vedie k reverznej transkripcii fragmentov RNA s vloženými náhodnými hexamérovými primérmí do prvého vlákna cDNA použitím reverznej transkriptázy.

Postup

1. Vytiahnite platničku CF PCR z tepelného cyklovača.
2. Pipetovaním (10-krát) premiešajte zmes FSM + RVT Master Mix. Overte, či je zmes FSM + RVT úplne homogénna.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 8 µl zmesi FSM + RVT Master Mix.
4. 10-násobným pipetovaním premiešajte.
5. Zvyšnú zmes FSM + RVT Master Mix zlikvidujte.
6. Na platničku CF PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
7. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 1 minútu.
8. Odstredujte pri otáčkach 280 × g 1 minútu.
9. Vložte do tepelného cyklovača a spustite program 1stSS.
Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).
10. Keď vzorky dosiahnu 4 °C, ihneď pokračujte ďalším krokom.

Vzorky prvého vlákna je možné ponechať pri teplote 4 °C max. 5 minút.

Syntetizácia druhého vlákna cDNA

Tento proces odstraňuje templát RNA a syntetizuje dvojvláknovú cDNA.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúcu reagenciu.
 - SSM – 10-násobným preklopením premiešajte. Krátko odstredte.

Postup

1. Vyťahnite platničku CF PCR z tepelného cyklovača.
2. Do každej jamky na vzorku pridajte 25 µl SSM.
3. Na platničku CF PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
4. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 1 minútu.
5. Odstreďujte pri otáčkach 280 × g 1 minútu.
6. Vložte do tepelného cyklovača a spustite program 2ndSS. Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).
7. Keď vzorky dosiahnu 4 °C, počkajte jednu minútu a potom ihneď pokračujte ďalším krokom.

Čistenie cDNA

V tomto procese sa používa SPB na odstránenie nežiaducich komponentov reakcie z cDNA. Gulôčky sa premývajú dvakrát pomocou čerstvo pripraveného 80 % etanolu. cDNA sa získa elúciou použitím RSB.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagencie.
 - SPB – dbajte na to, aby sa gulôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou.
 - RSB – tento produkt si odložte na použitie v rámci postupu.
2. Do 15 ml alebo 50 ml kónickej skúmavky si pripravte čerstvý 80 % EtOH.

Tabuľka 15 Príprava čerstvého 80 % EtOH

Reagencia	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc
100 % etanol, alkohol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
Voda bez obsahu RNázy/DNázy	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Vírením premiešajte čerstvý 80 % EtOH.
4. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako BIND1 (viazanie cDNA).
5. Zakryte a odložte nabok.
6. Nastavte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vytiahnite platničku CF PCR z tepelného cyklovača.
2. Vírením miešajte SPB 1 minútu, aby sa resuspendovali guľôčky.
3. Ihneď pridajte 90 µl SPB do každej jamky na vzorku na platničke BIND1 MIDI.
Ak na dávkovanie SPB používate úzku vaničku, zahrňte faktor prebytku 1,05 v prípade, ak vytvárate postačujúce alikvoty materiálu na vzorku. Po pridaní SPB do každej jamky na vzorku zlikvidujte všetok zvyšný materiál.
4. Preneste celý objem (50 µl) každej vzorky z platničky CF PCR do príslušnej jamky na platničke BIND1 MIDI.
5. Prázdnu platničku CF PCR zlikvidujte.
6. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku BIND1 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
7. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
8. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
9. Vložte platničku BIND1 MIDI do magnetického stojana na 5 minút.
10. Pomocou pipety P20 nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky na vzorku bez narušenia guľôčkovej pelety.

Premývanie

1. Guľôčky premyte nasledujúcim spôsobom.
 - a. Ponechajte ich na magnetickom stojane a do každej jamky pridajte 200 µl čerstvo pripraveného 80 % EtOH.
 - b. Počkajte 30 sekúnd.
 - c. Supernatant z každej jamky odstráňte a zlikvidujte.
2. Guľôčky premyte *druhý raz*.
3. Z každej jamky odstráňte zvyškový EtOH.
Použite pipetu P20 s tenkými špičkami.
4. Nepoužitý 80 % EtOH zlikvidujte.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku BIND1 MIDI z magnetického stojana.
2. Preklopením alebo vírením premiešajte RSB.

3. Do každej jamky na vzorku pridajte 22 µl RSB.
4. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku BIND1 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
6. Inkubujte pri izbovej teplote 2 minúty.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako PCF (purifikované fragmenty cDNA).
Ak zastavenie vykonáte v mieste **BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA** na strane 49, použite platničku PCR.
9. Preneste 20 µl eluátu z každej jamky so vzorkou na platničke BIND1 MIDI do príslušnej jamky na platničke PCF.
10. Prázdnu platničku BIND1 MIDI zlikvidujte.
11. Pridajte 30 µl RSB do každej jamky so vzorkou na platničke PCF.
12. Pipetovaním premiešajte 10-krát.
13. Na platničku PCF umiestnite adhezívne tesniace pokrytie a platničku uchovávajte na ľade.
14. Produkty EPH3, FSM, RVT a SSM vráťte na miesto skladovania.
15. Ak spracúvate vzorky odvodené iba z RNA (cDNA) a nezastavujete v bode bezpečného zastavenia, pokračujte časťou **Oprava konca a A-Tailing (pridávanie bázy A)** na strane 52.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, odstred'ujte platničku PCF PCR s otáčkami 280 x g 1 minútu a skladujte ju v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 7 dní.

Príprava na kroky protokolu

1. Vytiahnite kontroly DNA z miesta uloženia.
2. Vytiahnite skúmavku s reagensiou z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 16 Súprava TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (č. položky 20031119)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
TEB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Fragmentácia gDNA

Fragmentácia gDNA

Tento proces slúži na fragmentáciu gDNA a generovanie fragmentov dsDNA s presahmi 3' alebo 5'.

Príprava

1. Na kvantifikáciu vzoriek postupujte podľa odporúčaní v časti **Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny** na strane 27.

2. Pripravte si nasledujúcu reagenciu.
 - TEB – produkt premiešajte preklápaním alebo vírením.

Postup

Príprava platničky

1. Na prípravu platničky použite niektorú z nasledujúcich troch možností.
 - Možnosť č. 1: Vzorky gDNA spracujte súbežne so vzorkami cDNA na platničke PCF MIDI.
 - a. Označte platničku PCF MIDI ako LP (príprava knižnice).
 - b. Uložte ju na ľad a odložte nabok na použitie v časti [Prenos fragmentovanej DNA na strane 51](#).
 - Možnosť č. 2: Vzorky gDNA spracujte súbežne so vzorkami cDNA – platnička PCF PCR je zmrazená.
 - a. Rozmrazte platničku PCF PCR a ponechajte ju nadobudnúť izbovú teplotu.
 - b. Odstreďujte pri otáčkach 280 × g 1 minútu.
 - c. 10-násobným pipetovaním premiešajte.
 - d. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako LP (príprava knižnice).
 - e. Preneste celých 50 µl každej vzorky z platničky PCF PCR do príslušnej jamky na platničke LP MIDI.
 - f. Platničku PCF PCR zlikvidujte.
 - g. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie a uložte na ľad až do kroku [Prenos fragmentovanej DNA na strane 51](#).
 - Možnosť č. 3: Spracujte iba vzorky gDNA.
 - a. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako LP (príprava knižnice).
 - b. Ak vykonáte zastavenie v mieste [BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA na strane 51](#), použite platničku PCR.
 - c. Zakryte ju a odložte nabok na použitie podľa časti [Prenos fragmentovanej DNA na strane 51](#).

Riedenie gDNA

1. Pri izbovej teplote rozmrazte vzorky gDNA a kontroly DNA.
2. Premiešajte 10-násobným pipetovaním každej vzorky gDNA.
3. Krátkym odstredením skúmavky zhromaždíte kvapky.
4. Preklopením alebo vírením premiešajte TEB.
5. TEB použite na prípravu každej vzorky gDNA so záverečným objemom 52 µl. Prečítajte si nasledujúcu tabuľku, v ktorej nájdete informácie o vstupných množstvách a minimálnych koncentráciách podľa typu vzorky. Analýza vyžaduje minimálnu koncentráciu extrakcie, aby sa získalo najmenej 40 µl TEB z celkového objemu 52 µl. V prípade kontrol DNA použite koncentráciu uvedenú na štítku skúmavky. Na zabránenie strate vzorky nepipetujte menej než 2 µl vzorky do tejto dilúcie.

Typ vzorky	Vstupné množstvo (ng)	Minimálna koncentrácia (ng/μl)
FFPE	40	3,33
Kontrola	40	Prečítajte si informácie na štítku skúmavky

Fragmentácia

1. Pridajte 52 μl každej vzorky gDNA do osobitnej jamky skúmavky určenej do ultrazvukového prístroja.



UPOZORNENIE

gDNA naplňajte do skúmavky pomaly a dbajte na to, aby sa v dolnej časti skúmavky nenachádzali žiadne vzduchové medzery. Ďalšie informácie nájdete v časti [Analýza na strane 30](#) a v pokynoch od výrobcu.

2. Zaznamenajte si orientáciu prúžka.
3. Pomocou ultrazvukového prístroja fragmentujte gDNA na fragmenty.

Prenos fragmentovanej DNA

1. Overte, či sa rozloženie platničky so vzorkami a indexmi pre každú vzorku zhodujú s chodom, ktorý ste vybrali na analýzu použitím analytického modulu TSO Comprehensive (EU).
2. Na regeneráciu vzorky postupujte podľa pokynov výrobcu ultrazvukového zariadenia.
V prípade niektorých typov skúmaviek do ultrazvukového zariadenia sa môže vyžadovať odstredovanie na konsolidáciu vzorky v skúmavke.
3. V prípade každej fragmentovanej vzorky gDNA použite pipetu p20 s tenkými špičkami na tri prenosy objemu 16,7 μl do prázdnej jamky na platničke LP MIDI.
4. Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku LP MIDI.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku LP PCR a odstredujte ju s otáčkami 280 × g 1 minútu. Skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C max. 7 dní.

Príprava na kroky protokolu

Overte, či sú nastavené programy tepelného cyklovača po amplifikácii. Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).

1. Pripravte si vedro s ľadom.
2. Vytiahnite skúmavku s reagenciou z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 17 Súprava TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (č. položky 20031118)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
ERA1-A	-25 °C až -15 °C	Uchovávajúte na ľade.	Oprava konca a A-Tailing (pridávanie bázy A)
ERA1-B	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Oprava konca a A-Tailing (pridávanie bázy A)
ALB1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Ligácia adaptérov
LIG3	-25 °C až -15 °C	Uchovávajúte na ľade.	Ligácia adaptérov
SUA1 (modré viečko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Ligácia adaptérov
UMI (biele viečko)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Ligácia adaptérov
STL	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Ligácia adaptérov
EPM	-25 °C až -15 °C	Uchovávajúte na ľade.	Indexovacie PCR

Tabuľka 18 Súprava TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (č. položky 20031119)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SPB (svetlozelený štítok)	2 °C až 8 °C	Preňte do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Vyčistenie ligácie
RSB	2 °C až 8 °C	Preňte do prostredia s izbovou teplotou.	Vyčistenie ligácie

Tabuľka 19 Súprava TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (č. položky 20031120)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
UPxx	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte príslušné skúmavky s indexovacím primérom na izbovú teplotu.	Indexovacie PCR

Tabuľka 20 Súprava TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (č. položky 20031126)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
CPxx	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte príslušné skúmavky s indexovacím primérom na izbovú teplotu.	Indexovacie PCR

Oprava konca a A-Tailing (pridávanie bázy A)

Tento proces slúži na korekciu presahov, ktoré sú výsledkom fragmentácie, pri ktorej vzniknú konce s presahujúcim koncom A, pomocou zmesi End Repair A-Tailing Master Mix (ERA1).

Aktivitou 3' až 5'-exonukleázy v tejto zmesi sa odstránia 3' presahy a aktivitou 5' až 3' polymerázy sa vyplnia 5' presahy. Počas tejto reakcie sú 3' konce sú upravené (A-tailing), aby sa zabránilo ich vzájomnej ligácii počas reakcie ligácie adaptéra.

Príprava

- Podľa nasledujúceho postupu nahrejte 2 inkubátory na mikrovzorky pomocou vložiek ohrievacieho bloku MIDI.
 - Nahrejte inkubátor na mikrovzorky na 30 °C.
 - Nahrejte inkubátor na mikrovzorky na 72 °C.
- Prípravte si nasledujúce reagensy.
 - ERA1-A – krátko odstredzte a pipetovaním premiešajte. Uchovávajte na ľade.
 - ERA1-B – vírením premiešajte a potom krátko odstredzte. Skontrolujte výskyt usadenín. V prípade ich existencie zahrejte skúmavku na 37 °C a pipetovaním obsah miešajte dovtedy, kým sa usadeniny nerozpustia.
- Prípravte si zmes ERA1 Master Mix do skúmavky do mikroadstredivky.

Tabuľka 21 Zmes ERA1 Master Mix¹

Súčasť zmesi Master Mix	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
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 Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagensiami na strane 34](#).

- Pomalým 10-násobným pipetovaním premiešajte na zaistenie homogenity, krátko odstredzte a potom uložte zmes ERA1 Master Mix na ľad.
- Na prípravu platničky si vyberte niektorú z nasledujúcich dvoch možností.
 - Možnosť č. 1: Ak sa vzorky nachádzajú na platničke MIDI:
 - Znova označte platničku MIDI ako LP2 (príprava knižnice 2).

Ak sa niektoré vzorky nachádzajú na osobitných platničkách MIDI, premiestnite všetky vzorky do osobitných jamiek na rovnakej platničke MIDI podľa rozloženia platničky.

- Možnosť č. 2: Ak je platnička zmrazená:
 - Rozmrzte platničku PCF PCR alebo platničku LP PCR a ponechajte ju nadobudnúť izbovú teplotu.
 - Odstredujte platničku s otáčkami 280 × g 1 minútu.
 - 10-násobným pipetovaním premiešajte.
 - Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako LP2 (príprava knižnice 2).
 - Preneste celých 50 µl každej vzorky z platničky PCF PCR alebo platničky LP PCR do príslušnej jamky na platničke LP2 MIDI.
 - Platničku PCF PCR alebo LP PCR zlikvidujte.

Postup

1. Pridajte 10 µl zmesi ERA1 Master Mix do každej jamky na vzorku na platničke LP2 MIDI.
2. Zvyšnú zmes ERA1 Master Mix zlikvidujte.
3. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku LP2 MIDI.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
4. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
5. Inkubujte 30 minút v nahriatom inkubátore na mikrovzorky pri teplote 30 °C.
6. Okamžite preneste do druhého nahriateho inkubátora na mikrovzorky a 20 minút inkubujte pri teplote 72 °C.
7. Na 5 minút uložte platničku LP2 MIDI na ľad.

Ligácia adaptérov

Týmto postupom sa adaptéry ligujú ku koncom fragmentov cDNA alebo gDNA.

Test TSO Comprehensive (EU) zahŕňa adaptéry SUA1 a UMI.

- Adaptéry SUA1 použite v prípade vzoriek RNA.
- Adaptéry UMI použite v prípade vzoriek DNA.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagensy.
 - ALB1 – vírením obsah min. 10 sekúnd premiešavajte a potom krátko odstredte.
 - LIG3 – krátko odstredte a pipetovaním premiešajte. Uchovávajte na ľade.
 - SUA1 – vírením obsah min. 10 sekúnd premiešavajte a potom krátko odstredte.
 - UMI – vírením obsah min. 10 sekúnd premiešavajte a potom krátko odstredte.
 - STL – tento produkt si odložte na použitie v rámci postupu.

Postup

1. Vytiahnite platničku LP2 MIDI z ľadu.
2. Pridajte 60 µl ALB1 do každej jamky na vzorku na platničke LP2 MIDI. ALB1 je viskózný roztok – počas pipetovania sa snažte minimalizovať tvorbu bublín.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 5 µl LIG3.
4. Pridajte adaptéry.
Nepoužívajte dovedna rôzne typy adaptérov.
 - Jamky na vzorky RNA – 10 µl SUA1 (modré viečko) do každej vzorky odvodenej z RNA.
 - Jamky na vzorky DNA – 10 µl UMI (biele viečko) do každej vzorky odvodenej z DNA.
5. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku LP2 MIDI.

Riadne utesnite okraje a jamky.

6. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
7. Inkubujte pri izbovej teplote 30 minút.
8. Vírením premiešajte produkt STL a potom krátko odstredte.
9. Pridajte 5 µl STL do každej jamky na vzorku na platničke LP2 MIDI.
10. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku LP2 MIDI.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
11. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.

Vyčistenie ligácie

V tomto postupe používa guľôčky SPB na purifikáciu adaptérom ligovaných fragmentov cDNA alebo gDNA a odstránenie nežiaducich produktov. Guľôčky sa premývajú dvakrát pomocou čerstvo pripraveného 80 % etanolu. Elúcia adaptérom ligovaných vzoriek sa vykonáva použitím guľôčok RSB.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagensy.
 - SPB – dbajte na to, aby sa guľôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou.
 - RSB – tento produkt si odložte na použitie v rámci postupu.
2. Do 15 ml alebo 50 ml kónickej skúmavky si pripravte čerstvý 80 % EtOH.

Tabuľka 22 Príprava čerstvého 80 % etanolu

Reagencia	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
100 % etanol, alkohol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Voda bez obsahu RNázy/DNázy	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Vírením premiešajte čerstvý 80 % EtOH.
4. Nastavte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vírením miešajte SPB 1 minútu, aby sa resuspendovali guľôčky.
2. Ihneď pridajte 112 µl SPB do každej jamky na vzorku na platničke LP2 MIDI.
Ak na dávkovanie SPB používate úzku vaničku, zahrňte faktor prebytku 1,05 v prípade, ak vytvárate postačujúce alikvoty materiálu na vzorku. Po pridaní SPB do každej jamky na vzorku zlikvidujte všetok zvyšný materiál.
3. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku LP2 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
4. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
5. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
6. Vložte platničku LP2 MIDI do magnetického stojana na 10 minút.
7. Pomocou pipety P200 nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky na vzorku bez narušenia guľôčkovej pelety.

Premývanie

1. Guľôčky premyte nasledujúcim spôsobom.
 - a. Ponechajte ich na magnetickom stojane a do každej jamky pridajte 200 µl čerstvo pripraveného 80 % EtOH.
 - b. Počkajte 30 sekúnd.
 - c. Odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky so vzorkou bez narušenia guľôčkovej pelety.
2. Guľôčky premyte *druhý raz*.
3. Z každej jamky odstráňte zvyškový EtOH.
Použite pipetu P20 s tenkými špičkami.
4. Nepoužitý 80 % EtOH zlikvidujte.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku LP2 MIDI z magnetického stojana.
2. Preklopením alebo vírením premiešajte RSB.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 27,5 µl RSB.
4. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku LP2 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
6. Inkubujte pri izbovej teplote 2 minúty.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako LS (vzorky knižnice).

9. Preneste 25 µl každého eluátu z platničky LP2 MIDI do zodpovedajúcej jamky na platničke LS PCR.
10. Prázdnu platničku LP2 MIDI zlikvidujte.

Indexovacie PCR

V tomto kroku sa fragmenty knižnice amplifikujú použitím primérov, ktoré pridávajú indexovacie sekvencie na multiplexovanie vzoriek. Výsledný produkt obsahuje kompletnú knižnicu cDNA a/alebo DNA fragmenty lemované adaptérmi požadovanými na generovanie klastrov.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - EPM – uchovávajte na ľade.
 - UPxx – vírením premiešajte a potom krátko odstredte. UPxx je indexovací primér vybraný na obrazovke Create Run (Vytvorenie chodu) v softvéri Local Run Manager počas nastavovania chodu.
 - CPxx – vírením premiešajte a potom krátko odstredte. CPxx je indexovací primér vybraný na obrazovke Create Run (Vytvorenie chodu) v softvéri Local Run Manager počas nastavovania chodu.
2. Počas nastavovania chodu dbajte na to, aby sa indexy pre každú vzorku zhodovali s chodom naplánovaným v analytickom module TSO Comprehensive (EU). Dodržiavajte pokyny týkajúce sa výberu indexov v časti [Počet knižníc a výber indexov na strane 37](#).



UPOZORNENIE

Nesúlad medzi vzorkami a indexovacími primérami môže spôsobiť vykázanie nesprávneho výsledku v dôsledku toho, že sa nepodarí pozitívne identifikovať vzorku.

Postup

1. Pridajte 5 µl príslušného indexovacieho priméru (UPxx alebo CPxx) do zodpovedajúcej jamky na vzorku v platničke LS PCR podľa vybraných indexov.



UPOZORNENIE

Naraz vždy otvárajte a manipulujte iba s jednou skúmavkou s indexovacím primérom. Každú skúmavku s indexom ihneď po použití uzavrite novým viečkom. Indexovacie priméry nepoužívajte spoločne.

2. Vírením 5 sekúnd miešajte EPM a potom tento produkt krátko odstredte.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 20 µl EPM.
4. Na platničku LS PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
5. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 1 minútu.
6. Vráťte predamplifikačné reagenty na miesto uloženia.

**UPOZORNENIE**

Všetky nasledujúce kroky vykonávajte v oblasti po amplifikácii, aby nedošlo k prenosu produktu amplifikácie.

7. Odstredujte platničku LS PCR s otáčkami 280 x g 1 minútu.
8. Vložte do vopred naprogramovaného postamplifikačného tepelného cyklovača a spustite program I-PCR. Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).

POZNÁMKA Ak budete pokračovať časťou [Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59](#), postupujte podľa pokynov na rozmrazenie reagensí uvedených v časti Príprava krokov protokolu.

9. Po dokončení programu I-PCR odstredujte platničku LS PCR s otáčkami 280 x g 1 minútu.
10. Platničku označte ako ALS (amplifikované vzorky knižnice).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, skladujte platničku ALS PCR v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 30 dní.

Príprava na kroky protokolu

1. Overte, či sú nastavené programy tepelného cyklovača po amplifikácii. Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).
2. Vytiahnite skúmavku s reagensiou z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 23 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
TCB1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Nastavenie prvej hybridizácie

Tabuľka 24 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
TCA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie prvej hybridizácie

Tabuľka 25 Súprava TruSight Oncology Comp Content Set Box (č. položky 20031122)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
OPR1 (červený uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie prvej hybridizácie

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
OPD2 (biely uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie prvej hybridizácie

Nastavenie prvej hybridizácie

Počas tohto procesu sa zmes oligonukleotidov hybridizuje na knižnice cDNA a zmes oligonukleotidov sa hybridizuje na knižnice gDNA pripravené v kroku [Indexovacie PCR na strane 57](#). Na obohatenie cieľných oblastí sa vyžadujú dva kroky hybridizácie. V rámci prvej hybridizácie sa hybridizujú oligonukleotidy cez noc na knižnice cDNA alebo gDNA (8 hodín až 24 hodín).

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - TCB1 – na 5 minút zahrejte skúmavku na 37 °C. Vírením obsah 10 sekúnd premiešajte a potom krátko odstredte.
 - TCA1 – vírivým spôsobom premiešajte a potom krátko odstredte.
 - OPR1 – vírivým spôsobom premiešajte a potom krátko odstredte.
 - OPD2 – vírivým spôsobom premiešajte a potom krátko odstredte.
2. Ak bola platnička ALS PCR uložená na mieste uchovávania, rozmrazte ju na izbovú teplotu a 1 minútu odstredujte s otáčkami 280 × g. Potom obsah pipetovaním premiešajte.
3. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako HYB1 (hybridizácia 1).

Postup

1. Preneste 20 µl každej knižnice cDNA a gDNA z platničky ALS PCR do príslušnej jamky na platničke HYB1 PCR.
2. Na platničku ALS PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie a odložte ju nabok. Riadne utesnite okraje a jamky.
3. Skontrolujte výskyt usadenín v TCB1. Ak sú prítomné, znova zahrejte skúmavku a vírením miešajte jej obsah dovedy, kým sa kryštály nerozpustia.
4. Pridajte 15 µl TCB1 do každej jamky knižnice na platničke HYB1 PCR.
5. Pridajte 10 µl TCA1 do každej jamky knižnice na platničke HYB1 PCR.
6. Pridajte sondy.

Nepoužívajte spolu rôzne typy sond. Do každej jamky pridajte iba jednu súpravu sondy.

 - Jamky knižnice RNA – 5 µl OPR1 (červený uzáver) do každej knižnice odvodenej z RNA.
 - Jamky knižnice DNA TSO Comprehensive (EU) – 5 µl OPD2 (biely uzáver) do každej knižnice odvodenej z DNA na obohatenie TSO Comprehensive (EU).
7. Na platničku HYB1 PCR umiestnite adhezívne tesniace pokrytie

**UPOZORNENIE**

Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.

8. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 2 minúty.
9. Vložte do tepelného cyklovača a spustite program HYB1.
Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).
10. Hybridizujte pri teplote 57 °C minimálne 8 hodín (max. 24 hodín).
11. Vráťte hybridizačné reagencie na miesto uloženia.
12. Platničku ALS PCR skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C max. 30 dní.

Príprava na kroky protokolu

1. Na začiatku 2. dňa vyťahnite skúmavku s reageniou z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 26 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SMB (tmavomodrý štítok)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Prvé zachytenie cieľov Druhé zachytenie cieľov
ET2	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Prvé zachytenie cieľov Druhé zachytenie cieľov
HP3	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Prvé zachytenie cieľov Druhé zachytenie cieľov Normalizácia knižníc
TCB1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Nastavenie druhej hybridizácie
RSB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Druhé zachytenie cieľov Čistenie amplifikovanej obohatenej knižnice

Tabuľka 27 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
EE2	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Prvé zachytenie cieľov Druhé zachytenie cieľov Normalizácia knižníc
EEW	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Prvé zachytenie cieľov
TCA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie druhej hybridizácie

Tabuľka 28 Súprava Assay Content Set Box (č. položky 20031122)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
OPR1 (červený uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie druhej hybridizácie
OPD2 (biely uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Nastavenie druhej hybridizácie

Prvé zachytenie cieľov

V tomto kroku sa používa SMB na zachytenie sond hybridizovaných na ciele oblasti záujmu. Gulôčky sa trikrát premývajú použitím EEW. Elúcia obohatených knižníc sa vykonáva pomocou čerstvo pripravenej elučnej zmesi EE2 + HP3 Elution Mix a neutralizácia sa vykonáva pomocou ET2.

Príprava

- Nahrejte inkubátor na mikrovzorky pomocou vložky ohrievacieho bloku MIDI na 57 °C.
- Prípravte si nasledujúce reagenty.
 - EEW – vírivým spôsobom miešajte obsah 1 minútu.
 - EE2 – vírením premiešajte a potom krátko odstredte.
 - HP3 – vírením premiešajte a potom krátko odstredte.
 - SMB – dbajte na to, aby sa gulôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou. V rámci tejto procedúry používajte SMB, nie SPB.
 - ET2 – tento produkt si odložte na ďalšie v rámci postupu.
- Prípravte si čerstvú elučnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix v skúmavke do mikroadstredivky.

Tabuľka 29 Zmes EE2 + HP3 Elution Mix na prvé zachytenie cieľa

Súčasť elučnej zmesi	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagentami na strane 34](#).

4. Vírením premiešajte zmes EE2 + HP3 Elution Mix a potom krátko odstredte. Produkt si odložte na použitie v kroku [Elúcia na strane 63](#).
5. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako CAP1 (zachytenie 1).
6. Nastavte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vytiahnite platničku HYB1 PCR z tepelného cyklovača.
2. Odstreďujte platničku HYB1 PCR pri otáčkach 280 × g 1 minútu.
3. Vírením miešajte SMB 1 minútu, aby sa resuspendovali guľôčky.
4. Do každej jamky knižnice platničky CAP1 MIDI ihneď pridajte 150 µl SMB.
Ak na dávkovanie SPB používate úzku vaničku, zahrňte faktor pokrytia 1,15 v prípade, ak vytvárate postačujúce alikvoty materiálu na vzorku. Po pridaní SMB do každej jamky na vzorku zlikvidujte všetok zvyšný materiál.
5. Nastavte pipetu na 50 µl a preneste celý objem každej knižnice z platničky HYB1 PCR do príslušnej jamky na platničke CAP1 MIDI.
6. Prázdnu platničku HYB1 PCR zlikvidujte.
7. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku CAP1 MIDI.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
8. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
9. Inkubujte 25 minút v nahriatom inkubátore na mikrovzorky pri teplote 57 °C.
10. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
11. Ponechajte platničku CAP1 MIDI na magnetickom stojane a pomocou pipety P200 nastavenej na 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant bez narušenia guľôčkovej pelety.



UPOZORNENIE

Ihneď pokračujte ďalším krokom. ([Premývanie na strane 63.](#)) Dbajte na to, aby sa guľôčková peleta dlhší čas neusádzala bez prítomnosti kvapaliny.

Premývanie

1. Gulôčky premyte nasledujúcim spôsobom.
 - a. Vytiahnite platničku CAP1 MIDI z magnetického stojana.
 - b. Do každej jamky pridajte 200 µl EEW.
 - c. Nastavte objem pipety na 150 µl a zmes pipetovaním premiešajte (minimálne 10-krát). Dbajte na to, aby sa všetky gulôčky resuspendovali.



UPOZORNENIE

Dbajte na to, aby nezostali žiadne gulôčkové pelety – opatrne aspirujte celý roztok s gulôčkami do špičky. Potom skontrolujte, či sa v dolnej časti žiadnej jamky nenachádza peleta. Nahnite špičku pipety smerom k pelete gulôčok počas krokov premývania, aby sa peleta dislokovala. Dbajte na to, aby sa gulôčková peleta nachádzala úplne celá v roztoku. Roztok by mal mať tmavohnedú farbu a homogénnu konzistenciu.

- d. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku CAP1 MIDI.
 - e. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
 - f. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 4 minúty.
 - g. Inkubujte 5 minút v nahriatom inkubátore na mikrovzorky pri teplote 57 °C.
 - h. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
 - i. Ponechajte na magnetickom stojane a odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky bez narušenia gulôčkovej pelety.
2. Gulôčky premyte *druhý raz*.
 3. Gulôčky premyte *tretí raz*.
 4. Z každej jamky odstráňte zvyškový supernatant.
Použite pipetu P20 s tenkými špičkami.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku CAP1 MIDI z magnetického stojana.
2. Vírením premiešajte zmes EE2 + HP3 Elution Mix a potom krátko odstredte.
3. Opatrne pridajte 17 µl zmesi EE2 + HP3 Elution Mix do každej jamky knižnice na platničke CAP1 MIDI.
4. Zlikvidujte zvyšnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix.
5. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku CAP1 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
6. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako ELU1 (elúcia 1).
9. Vírením premiešajte ET2 a potom krátko odstredte.

10. Pridajte 5 µl ET2 do každej príslušnej jamky knižnice v novej platničke ELU1 PCR.
11. Opatrne preneste 15 µl eluátu z každej jamky na platničke CAP1 MIDI do príslušnej jamky na platničke ELU1 PCR.
12. Prázdnu platničku CAP1 MIDI zlikvidujte.
13. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku ELU1 PCR.
14. Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
15. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 2 minúty.
16. Vráťte produkt EEW na miesto uloženia.

Nastavenie druhej hybridizácie

Tento krok vedie k druhému viazaniu cielených oblastí obohatených knižníc cDNA a/alebo gDNA so záchytnými sondami. Druhá hybridizácia zaisťuje vysokú špecificitu zachytených oblastí. Na zaistenie optimálneho obohatenia knižníc vykonajte druhú hybridizáciu pri teplote 57 °C (min. 1,5 hodiny, max. 4 hodiny).

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagensy.
 - TCB1 – na 5 minút zahrejte skúmavku na 37 °C. Vírením obsah 10 sekúnd premiešajte a potom krátko odstredte.
 - TCA1 – vírivým spôsobom premiešajte a potom krátko odstredte.
 - OPR1 – vírivým spôsobom premiešajte a potom krátko odstredte.
 - OPD2 – vírivým spôsobom premiešajte a potom krátko odstredte.

Postup

1. Skontrolujte výskyt usadenín v TCB1. Ak sú prítomné, znova zahrejte skúmavku a vírením miešajte jej obsah dovtedy, kým sa kryštály nerozpustia.
2. Pridajte 15 µl TCB1 do každej jamky knižnice na platničke ELU1 PCR.
3. Pridajte 10 µl TCA1 do každej jamky knižnice.
4. Pridajte sondy.
Nepoužívajte spolu rôzne typy sond.
 - Jamky knižnice RNA – 5 µl OPR1 (červený uzáver) do každej knižnice odvodenej z RNA.
 - Jamky knižnice DNA TSO Comprehensive (EU) – 5 µl OPD2 (biely uzáver) do každej knižnice odvodenej z DNA na obohatenie TSO Comprehensive (EU).
5. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku ELU1 PCR.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
6. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 2 minúty.
7. Vložte do tepelného cyklovača a spustite program HYB2.
Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).

8. Hybridizujte pri teplote 57 °C minimálne 1,5 hodín (max. 4 hodín).
9. Vráťte hybridizačné reagenty na miesto uloženia.

Druhé zachytenie cieľov

V tomto kroku sa používa SMB na zachytenie sond hybridizovaných na ciele oblasti záujmu. Gulôčky sa raz premývajú použitím RSB. Elúcia obohatených knižníc sa vykonáva pomocou čerstvo pripravenej elučnej zmesi EE2 + HP3 Elution Mix a neutralizácia sa vykonáva pomocou ET2.

Príprava

1. Nahrejte inkubátor na mikrovzorky pomocou vložky ohrievacieho bloku MIDI na 57 °C.
2. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - EE2 – vírením premiešajte a potom krátko odstredte.
 - HP3 – vírením premiešajte a potom krátko odstredte.
 - SMB – dbajte na to, aby sa gulôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou. V rámci tejto procedúry používajte SMB, nie SPB.
 - RSB – tento produkt si odložte na použitie v rámci postupu.
 - ET2 – tento produkt si odložte na ďalšie v rámci postupu.
3. Pripravte si čerstvú elučnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix v skúmavke do mikroadstredivky.

Tabuľka 30 Elučná zmes EE2 + HP3 Elution Mix na prvé zachytenie cieľa

Súčasť elučnej zmesi	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagentami na strane 34](#).

4. Vírením premiešajte a potom krátko odstredte. Produkt si odložte na použitie v kroku [Elúcia na strane 67](#).
5. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako CAP2 (zachytenie 2).
6. Nastavte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vytiahnite platničku ELU1 PCR z tepelného cyklovača.
2. Odstredujte platničku ELU1 PCR pri rýchlosti 280 × g 1 minútu.
3. Vírením miešajte SMB 1 minútu, aby sa resuspendovali gulôčky.
4. Do každej jamky knižnice platničky CAP2 MIDI ihneď pridajte 150 µl SMB.

Ak na dávkovanie SPB používate úzku vaničku, zahrňte faktor pokrytia 1,15 v prípade, ak vytvárate postačujúce alikvoty materiálu na vzorku. Po pridaní SMB do každej jamky na vzorku zlikvidujte všetok zvyšný materiál.

5. Nastavte pipetu na 50 µl a celý objem každej knižnice preneste z platničky ELU1 PCR do príslušnej jamky na platničke CAP2 MIDI.
6. Prázdnu platničku ELU1 PCR zlikvidujte.
7. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku CAP2 MIDI.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
8. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
9. Inkubujte 25 minút v nahriatom inkubátore na mikrovzorky pri teplote 57 °C.

POZNÁMKA Ak pokračujete krokom [Amplifikácia obohatenej knižnice na strane 68](#), postupujte podľa pokynov v časti Príprava na kroky protokolu.

10. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
11. Ponechajte platničku CAP2 MIDI na magnetickom stojane a pomocou pipety P200 nastavenej 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky knižnice bez narušenia guľôčkovej pelety.



UPOZORNENIE

Ihneď pokračujte ďalším krokom. ([Premývanie na strane 66](#).) Dbajte na to, aby sa guľôčková peleta dlhší čas neusádzala bez prítomnosti kvapaliny.

Premývanie

1. Vytiahnite platničku CAP2 MIDI z magnetického stojana.
2. Preklopením alebo vírením premiešajte RSB.
3. Do každej jamky na vzorku pridajte 200 µl RSB.
4. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku CAP2 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 4 minúty.
6. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
7. Ponechajte platničku CAP2 MIDI na magnetickom stojane a odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant bez narušenia guľôčkovej pelety.
8. Z každej jamky odstráňte zvyškový supernatant.
Použite pipetu P20 s tenkými špičkami.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku CAP2 MIDI z magnetického stojana.
2. Vírením premiešajte zmes EE2 + HP3 Elution Mix a potom krátko odstredíte.
3. Pridajte 22 µl zmesi EE2 + HP3 Elution Mix do každej jamky knižnice na platničke CAP2 MIDI.
4. Zlikvidujte zvyšnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix.
5. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku CAP2 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
6. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako ELU2 (elúcia 2).
9. Vírením premiešajte ET2 a potom krátko odstredíte.
10. Pridajte 5 µl ET2 do každej príslušnej jamky knižnice v novej platničke ELU2 PCR.
11. Opatrne preneste 20 µl eluátu z každej jamky na platničke CAP2 MIDI do príslušnej jamky na platničke ELU2 PCR.
12. Prázdnu platničku CAP2 MIDI zlikvidujte.
13. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku ELU2 PCR.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
14. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 2 minúty.
15. Vráťte SMB, EE2, HP3 a ET2 na miesto uloženia.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, odstred'ujte platničku ELU2 PCR s otáčkami 280 x g 1 minútu a skladujte ju v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 7 dní. Vráťte RSB na miesto uloženia.

Príprava na kroky protokolu

1. Pripravte si vedro s ľadom.
2. Vytiahnite skúmavku s reagensiou z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 31 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
PPC3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Amplifikácia obohatenej knižnice
EPM	-25 °C až -15 °C	Uchovávajúte na ľade.	Amplifikácia obohatenej knižnice

Tabuľka 32 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
SPB (svetlozelený štítok)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Čistenie amplifikovanej obohatenej knižnice
RSB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Čistenie amplifikovanej obohatenej knižnice Príprava na sekvenovanie

Amplifikácia obohatenej knižnice

V tomto kroku sa používajú priméry na amplifikáciu obohatených knižníc.

Príprava

1. Ak bola platnička ELU2 uložená na mieste uchovávania, rozmrazte ju na izbovú teplotu a 1 minútu odstredujte s otáčkami 280 × g.

Postup

1. Vírením premiešajte PPC3 a potom krátko odstredte.
2. Pridajte 5 µl PPC3 do každej jamky knižnice na platničke ELU2 PCR.
3. Vírením 5 sekúnd miešajte EPM a potom tento produkt krátko odstredte.
4. Pridajte 20 µl EPM do každej jamky knižnice.
5. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku ELU2 PCR.
Okraje a jamky riadne utesnite, aby nedošlo k odparovaniu.
6. Pretrepávajte pri otáčkach 1200 ot./min 2 minúty.
7. Vložte do tepelného cyklovača a spustite program EL-PCR.
Prečítajte si časť [Programovanie tepelného cyklovača na strane 43](#).

Poznámka Ak pokračujete krokom [Normalizácia knižníc na strane 71](#), postupujte podľa pokynov v časti Príprava na kroky protokolu.

8. Vráťte PPC3 a EPM na miesto uchovávania.

Čistenie amplifikovanej obohatenej knižnice

V tomto kroku sa používajú guľôčky SPB na purifikáciu obohatených knižníc od nežiaducich komponentov reakcie. Guľôčky sa premývajú dvakrát pomocou čerstvo pripraveného 80 % etanolu. Knižnice sa získavajú elúciou použitím guľôčok RSB.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagensy.
 - SPB – dbajte na to, aby sa guľôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou. V rámci tohto postupu používajte SPB – nie SMB.
 - RSB – tento produkt si odložte na použitie v rámci postupu.
2. Do 15 ml alebo 50 ml kónickej skúmavky si pripravte čerstvý 80 % etanol.

Tabuľka 33 Príprava čerstvého 80 % etanolu

Reagencia	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
100 % etanol, alkohol, čistý	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
Voda bez obsahu RNázy/DNázy	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Vírením premiešajte čerstvý 80 % EtOH.
4. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako BIND2 (vyčistenie väzby).
5. Nastavte magnet.

Postup

Viazanie

1. Vytiahnite platničku ELU2 PCR z tepelného cyklovača.
2. Odstredujte platničku ELU2 PCR pri rýchlosti 280 × g 1 minútu.
3. Vírením miešajte SPB 1 minútu, aby sa resuspendovali guľôčky.
4. Do každej jamky knižnice platničky BIND2 MIDI ihneď pridajte 110 µl SPB.
5. Preneste 50 µl každej knižnice z platničky ELU2 PCR do príslušnej jamky na platničke BIND2 MIDI.
6. Prázdnu platničku ELU2 PCR zlikvidujte.
7. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku BIND2 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
8. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
9. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
10. Na 5 minút položte platničku na magnetický stojan.
11. Pomocou pipety P200 nastavenej na objem 200 µl odstráňte a zlikvidujte *všetok* supernatant z každej jamky knižnice bez narušenia guľôčkovej pelety.

Premývanie

1. Gulôčky premyte nasledujúcim spôsobom.
 - a. Ponechajte ich na magnetickom stojane a do každej jamky pridajte 200 µl čerstvo pripraveného 80 % EtOH.
 - b. Počkajte 30 sekúnd.
 - c. Odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky so vzorkou bez narušenia gulôčkovej pelety.
2. Gulôčky premyte *druhý* raz.
3. Z každej jamky odstráňte zvyškový EtOH.
Použite pipetu P20 s tenkými špičkami.
4. Nepoužitý 80 % EtOH zlikvidujte.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku BIND2 MIDI z magnetického stojana.
2. RSB premiešajte preklápaním alebo vírením.
3. Pridajte 32 µl RSB do každej jamky knižnice.
4. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku BIND2 MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
6. Inkubujte pri izbovej teplote 2 minúty.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako PL (purifikované knižnice, Purified Libraries).
9. Preneste 30 µl každého eluátu z platničky BIND2 MIDI do príslušnej jamky na platničke PL PCR.
10. Prázdnu platničku BIND2 MIDI zlikvidujte.
11. Aplikujte adhezívne tesniace pokrytie na platničku PL PCR.
12. Vráťte SPB na miesto uloženia.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, odstredujte platničku PL PCR s otáčkami 280 x g 1 minútu a skladujte ju v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 30 dní. Vráťte RSB na miesto uloženia.

Príprava na kroky protokolu

1. Vytiahnite skúmavku s reagensiou z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 34 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
LNA1	-25 °C až -15 °C	Rozmrzajte na izbovú teplotu.	Normalizácia knižníc

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
EE2	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu.	Normalizácia knižníc

Tabuľka 35 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
LNB1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou na 30 minút.	Normalizácia knižníc
HP3	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Normalizácia knižníc Príprava na sekvenovanie
LNW1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Normalizácia knižníc
LNS1	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Normalizácia knižníc

2. Ak v rovnaký deň pokračujete krokom [Príprava na sekvenovanie na strane 75](#), postupujte podľa krokov rozmrazenia v časti Príprava na kroky protokolu.

Normalizácia knižníc

V tomto procese sa používa produkt LNB1 spolu s aditívami (LNA1) na normalizáciu množstva každej knižnice na zaistenie jednotného zastúpenia knižníc v kombinovaných knižniciach (pool). Gulôčky sa dvakrát premyjú pomocou produktu LNW1. Elúcia knižníc sa vykonáva pomocou čerstvo pripravenej zmesi EE2 + HP3 Elution Mix s následnou neutralizáciou pomocou LNS1.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúce reagenty.
 - LNB1 – dbajte na to, aby sa gulôčky 30 minút nachádzali v prostredí s izbovou teplotou.
 - LNA1 – vírením premiešajte.
 - EE2 – vírením premiešajte a potom krátko odstredte.
 - HP3 – vírením premiešajte a potom krátko odstredte.
 - LNW1 – vírením premiešajte. Uložte bokom na ďalšie použitie v postupe.
 - LNS1 – vírením premiešajte. Uložte bokom na ďalšie použitie v postupe.
2. Vírením miešajte LNB1 1 minútu, aby sa resuspendovali gulôčky.
Preklápaním skúmavky s LNB1 zaistíte resuspendovanie gulôčok.
3. Pomocou pipety P1000 nastavenej na objem 800 µl pipetujte LNB1 10-krát nahor a nadol na zaistenie resuspenzie.

4. Okamžite si pripravte čerstvú zmes LNA1 + LNB1 Master Mix v kónickej skúmavke.



UPOZORNENIE

Úplne resuspendujte guľôčkovú peletu LNB1 v spodnej časti skúmavky, aby ste zabránili nekonzistentnej hustote klastra.

Tabuľka 36 Zmes LNA1 + LNB1 Master Mix

Súčasť zmesi Master Mix	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagensiami na strane 34](#).

5. Vírením premiešajte zmes LNA1 + LNB1 Master Mix. Odložte ju na použitie v kroku [Viazanie na strane 72](#).
6. Pripravte si čerstvú elučnú zmes EE2 + HP3 Elution Mix v skúmavke do mikroadstredivky.

Tabuľka 37 Zmes EE2 + HP3 Elution Mix na normalizáciu knižníc

Súčasť elučnej zmesi	4 knižnice	8 knižníc	16 knižníc	24 knižníc	48 knižníc
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Táto tabuľka obsahuje objemový prebytok. Informácie o výpočtoch nájdete v časti [Manipulácia s reagensiami na strane 34](#).

7. Vírením premiešajte čerstvú zmes na elúciu a potom vykonajte krátke odstredenie. Produkt si odložte na použitie v kroku [Elúcia na strane 73](#).
8. Ak bola platnička PL PCR uložená na mieste uchovávania, rozmrazte ju na izbovú teplotu, 1 minútu odstredujte s otáčkami 280 x g a pipetovaním premiešajte obsah.
9. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako BBN (Bead-Based Normalization, guľôčková normalizácia).
10. Nastavte magnet.

Postup

Viazanie

- Vírením premiešajte zmes LNA1 + LNB1 Master Mix.
- Okamžite pridajte 45 µl zmesi LNA1 + LNB1 Master Mix do každej jamky knižnice na platničke BBN MIDI.
- Zvyšnú zmes LNA1 + LNB1 Master Mix zlikvidujte.
- Preňte 20 µl každej knižnice z platničky PL PCR do zodpovedajúcej jamky na platničke BBN MIDI.
- Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku BBN MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
- Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 30 minút.
- Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku PL PCR a vráťte platničku na miesto uloženia.

8. Na 2 minúty položte platničku na magnetický stojan.
9. Ponechajte platničku na magnetickom stojane a pomocou pipety P20 odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky bez narušenia guľôčkovej pelety.

Premývanie

1. Guľôčky premyte nasledujúcim spôsobom.
 - a. Vytiahnite platničku BBN MIDI z magnetického stojana.
 - b. Pridajte 45 µl LNW1 do každej jamky knižnice.
 - c. Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku BBN MIDI.
 - d. Riadne utesnite okraje a jamky.
 - e. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 5 minút.
 - f. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
 - g. Odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky so vzorkou bez narušenia guľôčkovej pelety.
2. Guľôčky premyte *druhý raz*.
3. Z každej jamky odstráňte zvyškový supernatant.
Použite pipetu P20 s tenkými špičkami.

Elúcia

1. Vytiahnite platničku BBN MIDI z magnetického stojana.
2. Vírením premiešajte zmes EE2 + HP3 Elution Mix a potom krátko odstredte.
3. Pridajte 32 µl zmesi EE2 + HP3 Elution Mix do každej jamky knižnice na platničke BBN MIDI.
4. Zvyšnú zmes na elúciu zlikvidujte.
5. Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku BBN MIDI.
Riadne utesnite okraje a jamky.
6. Pretrepávajte pri otáčkach 1800 ot./min 2 minúty.
7. Na 2 minúty položte na magnetický stojan.
8. Označte novú platničku PCR s 96 jamkami ako NL (Normalized Libraries, normalizované knižnice).
9. Opatrne preneste 30 µl eluátu z každej jamky na platničke BBN MIDI do príslušnej jamky na platničke NL PCR.



UPOZORNENIE

Ak sa guľôčky aspirovali do pipetových špičiek, guľôčky nadávkujte naspäť na platničku v magnetickom stojane a počkajte, kým nebude kvapalina priehľadná (približne 2 minúty) pred tým, než vykonáte ďalší krok postupu.

10. Prázdnu platničku BBN MIDI zlikvidujte.
11. Produkt LNS1 premiešajte vírivým spôsobom.
12. Pridajte 30 µl LNS1 do každej jamky knižnice na novej platničke NL PCR.

13. Pipetovaním päťkrát premiešajte.
14. Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku NL PCR.
Riadne utesnite okraje a jamky.
15. Produkty LNB1, LNA1, EE2, LNW1 a LNS1 vráťte na miesto uloženia.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, odstred'ujte platničku NL PCR s otáčkami 280 x g 1 minútu a skladujte ju v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 30 dní.

Príprava na kroky protokolu

Začnite s prípravou spotrebných materiálov na sekvenovanie zo súpravy NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) (č. položky 20028871) najmenej jednu hodinu pred použitím.

1. Vytiahnite pufer na dilúciu knižnice (HT1) z miesta uskladnenia (-25 °C až -15 °C), rozmrazte ho na izbovú teplotu a uložte na ľad.
2. Pokiaľ ide o ďalší spotrebný materiál v súprave, postupujte podľa pokynov na prípravu uvedených v *referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.
 - Kazeta s reagensiami NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov)
 - Kazeta s pufrom NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklov)
 - Kazeta s prietokovými článkami NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklov)
3. Vytiahnite skúmavku s reagensiou z balenia a postupujte podľa pokynov na rozmrazenie.

Tabuľka 38 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (č. položky 20031121)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
Interná kontrola PhiX (PX3 alebo PhiX)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte na izbovú teplotu. Uchovávajte na ľade.	Príprava na sekvenovanie

Tabuľka 39 Súprava TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (č. položky 20031123)

Reagencia	Skladovanie	Pokyny na rozmrazenie	Krok protokolu
HP3	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Príprava na sekvenovanie
RSB (ružový štítk)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou.	Príprava na sekvenovanie

Príprava na sekvenovanie

Príprava

1. Prečítajte si pokyny v časti [Počet knižníc a výber indexov na strane 37](#).
2. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako dHP3 (zriedená HP3).
3. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako dPhiX (zriedená PhiX).
4. Zahrejte ohrievací blok na 96 °C pre skúmavky do mikroadstredivky.
5. Pripravte si vedro s ľadom.

Dilúcia a denaturácia kontroly PhiX

1. Vírením premiešajte HP3 a potom krátko odstredte.
2. Do skúmavky do mikroadstredivky dHP3 skombinujte nasledujúce objemy.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl vody bez obsahu RNázy/DNázy
3. Vírením premiešajte dHP3 a potom krátko odstredte.
4. Preklopením alebo vírením premiešajte RSB.
5. Vírením premiešajte kontrolu PhiX a potom krátko odstredte.
6. Do skúmavky do mikroadstredivky dPhiX skombinujte nasledujúce objemy.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl kontroly PhiX
7. Pridajte 10 µl dHP3 do skúmavky dPhiX.
8. Skúmavku dHP3 zlikvidujte.
9. Vírením premiešajte obsah skúmavky dPhiX a potom krátko odstredte.
10. Inkubujte dPhiX pri izbovej teplote 5 minút, aby došlo k denaturácii.
11. Produkt HT1 premiešajte vírivým spôsobom.
12. Ihneď pridajte 980 µl vopred vychladeného produktu HT1 do dPhiX.
13. Vírením premiešajte a potom krátko odstredte.
14. Uložte dPhiX na ľad až do momentu použitia počas prípravy druhého roztoku.
Záverečná koncentrácia je 20 pM dPhiX.
15. Vráťte produkty PhiX, HP3 a RSB na miesto uloženia.

Združovanie a denaturácia knižníc na analýzu TSO Comprehensive (EU)

1. Ak bola platnička NL PCR uložená na mieste uchovávania, rozmrazte ju na izbovú teplotu a 1 minútu odstredujte s otáčkami 280 × g.

2. Pomocou multikanálovej pipety nastavenej na 30 µl opatrne pipetovaním premiešajte knižnice na platničke NL PCR (päťkrát).

Na každú knižnicu použite nové špičky.



UPOZORNENIE

Na dosiahnutie požadovanej účinnosti riadne premiešajte knižnice.

3. Vyberte niektorú z nasledujúcich možností na združenie, denaturáciu a dilúciu knižníc.
 - Možnosť č. 1: Súbežné sekvenovanie knižníc odvodených zo vzoriek RNA a DNA. Prečítajte si časť [Možnosť č. 1: Knižnice DNA a RNA dovedna na strane 76](#).
 - Možnosť č. 2: Sekvenovanie knižníc odvodených iba zo vzoriek DNA. Prečítajte si časť [Možnosť č. 2: Iba knižnice DNA na strane 77](#).
 - Možnosť č. 3: Sekvenovanie knižníc odvodených iba zo vzoriek RNA. Prečítajte si časť [Možnosť č. 3: Iba knižnice RNA na strane 78](#).

Možnosť č. 1: Knižnice DNA a RNA dovedna

1. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako PRL (združené knižnice RNA, Pooled RNA Libraries).
2. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako PDL (združené knižnice DNA, Pooled DNA Libraries).
3. Preneste 10 µl každej normalizovanej knižnice RNA (cDNA) z platničky NL do skúmavky PRL. Nemiešajte dve knižnice s rovnakým indexovacím primérom.
4. Preneste 10 µl každej normalizovanej knižnice DNA z platničky NL do skúmavky PDL. Nemiešajte dve knižnice s rovnakým indexovacím primérom.
5. Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku NL PCR. Riadne utesnite okraje a jamky.
6. Vírivým spôsobom premiešajte obsah skúmaviek PRL a PDL.
7. Krátko odstredte obsah skúmaviek PRL a PDL.
8. Inkubujte skúmavky PRL a PDL v ohrievacom bloku pri teplote 96 °C 2 minúty.
9. Uložte skúmavky s PRL a PDL na 5 minút na ľad.
10. Vírením premiešajte skúmavky PRL a PDL a potom krátko odstredte.
11. Vráťte skúmavky PRL a PDL na ľad.

Príprava prvého roztoku

1. Štítkom označte skúmavku do mikroadstredivky ako DIL1 (dilúcia 1).
2. Preneste 20 µl PDL do prázdnej skúmavky DIL1.
3. Pridajte 5 µl PRL do DIL1.
4. Skúmavky PDL a PRL zlikvidujte.
5. Pridajte 475 µl vopred vychladeného produktu HT1 do skúmavky DIL1 (roztok v pomere 1 : 20).

6. Vírením premiešajte skúmavku DL1 a potom krátko odstredzte.

Príprava druhého roztoku

1. Označte 2,0 ml skúmavku do mikroadstredivky ako DIL2 (dilúcia 2).
2. Preneste 40 µl DIL1 do prázdnej skúmavky DIL2.
3. Skúmavku DIL1 zlikvidujte.
4. Pridajte 1660 µl vopred vychladeného produktu HT1 do skúmavky DIL2 (roztok v pomere 1 : 850).
5. Vírením premiešajte 20 pM dPhiX a potom tento produkt krátko odstredzte.
6. Pridajte 2,5 µl pripraveného produktu 20 pM dPhiX do skúmavky DIL2.
7. Vírením premiešajte a potom krátko odstredzte.
8. Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazenej kazety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov)
Viac informácií nájdete v *referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.
9. Skúmavku DIL2 zlikvidujte.
10. Odstredzte platničku NL PCR pri otáčkach 280 × g 1 minútu a uskladnite pri teplote -25 °C až -15 °C max. 30 dní.
11. Pokračujte sekvenovaním.
Viac informácií nájdete v *referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Možnosť č. 2: Iba knižnice DNA

1. Štítkom označte skúmavku do mikroadstredivky ako PDL (združené knižnice DNA, Pooled DNA Libraries).
2. Preneste 10 µl každej normalizovanej knižnice DNA z platničky NL do skúmavky PDL.
Nemiešajte dve knižnice s rovnakým indexovacím primérom.
3. Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku NL PCR.
Riadne utesnite okraje a jamky.
4. Umiestnite mikrotresnenie „B“ na platničku NL PCR.
Riadne utesnite okraje a jamky.
5. Obsah skúmavky PDL premiešajte vírivým spôsobom.
6. Skúmavku PDL krátko odstredzte.
7. Inkubujte skúmavku PDL v ohrievacom bloku pri teplote 96 °C 2 minúty.
8. Uložte skúmavku s PDL na 5 minút na ľad.
9. Vírením premiešajte PDL a potom krátko odstredzte.
10. Vráťte skúmavku PDL na ľad.

Príprava prvého roztoku

1. Štítkom označte skúmavku do mikroadstredivky ako DIL1 (dilúcia 1).
2. Preneste 10 µl PDL do prázdnej skúmavky DIL1.
3. Skúmavku PDL zlikvidujte.
4. Pridajte 190 µl vopred vychladeného produktu HT1 do skúmavky DIL1 (roztok v pomere 1 : 20).
5. Vírením premiešajte DIL1 a potom krátko odstredte.

Príprava druhého roztoku

1. Označte 2,0 ml skúmavku do mikroadstredivky ako DIL2 (dilúcia 2).
2. Preneste 40 µl DIL1 do prázdnej skúmavky DIL2.
3. Skúmavku DIL1 zlikvidujte.
4. Pridajte 1660 µl vopred vychladeného produktu HT1 do skúmavky DIL2 (roztok v pomere 1 : 850).
5. Vírením premiešajte 20 pM dPhiX a potom tento produkt krátko odstredte.
6. Pridajte 2,5 µl pripraveného produktu 20 pM dPhiX do skúmavky DIL2.
7. Vírením premiešajte a potom krátko odstredte.
8. Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazenej kazety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov)
Viac informácií nájdete v *referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.
9. Skúmavku DIL2 zlikvidujte.
10. Odstredujte platničku NL PCR pri otáčkach 280 × g 1 minútu a uskladnite pri teplote -25 °C až -15 °C max. 30 dní.
11. Pokračujte sekvenovaním.
Viac informácií nájdete v *referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Možnosť č. 3: Iba knižnice RNA

1. Označte skúmavku do mikroadstredivky ako PRL (združené knižnice RNA, Pooled RNA Libraries).
2. Preneste 10 µl každej normalizovanej knižnice RNA (cDNA) z platničky NL do skúmavky PRL.
Nemiešajte dve knižnice s rovnakým indexovacím primérom.
3. Umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku NL PCR.
Riadne utesnite okraje a jamky.
4. Obsah skúmavky PRL premiešajte vírivým spôsobom.
5. Skúmavku PRL krátko odstredte.
6. Inkubujte skúmavku PRL v ohrievacom bloku pri teplote 96 °C 2 minúty.
7. Uložte skúmavku s PRL na 5 minút na ľad.
8. Vírením premiešajte skúmavku PRL a potom krátko odstredte.
9. Vráťte skúmavku PRL na ľad.

Príprava prvého roztoku

1. Štítkom označte skúmavku do mikroadstredivky ako DIL1 (dilúcia 1).
2. Preneste 10 µl PRL do prázdnej skúmavky DIL1.
3. Skúmavku PRL zlikvidujte.
4. Pridajte 190 µl vopred vychladeného produktu HT1 do skúmavky DIL1 (roztok v pomere 1 : 20).
5. Vírením premiešajte DIL1 a potom krátko odstredíte.

Príprava druhého roztoku

1. Označte 2,0 ml skúmavku do mikroadstredivky ako DIL2 (dilúcia 2).
2. Preneste 40 µl DIL1 do prázdnej skúmavky DIL2.
3. Skúmavku DIL1 zlikvidujte.
4. Pridajte 1646 µl vopred vychladeného produktu HT1 do skúmavky DIL2 (roztok v pomere 1 : 843).
5. Vírením premiešajte 20 pM dPhiX a potom tento produkt krátko odstredíte.
6. Pridajte 16,7 µl pripraveného produktu 20 pM dPhiX do skúmavky DIL2.
7. Vírením premiešajte a potom krátko odstredíte.
8. Vložte 1300 µl DIL2 do rozmrazenej kazety NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov)
Viac informácií nájdete v *referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.
9. Skúmavku DIL2 zlikvidujte.
10. Odstredujte platničku NL PCR pri otáčkach 280 × g 1 minútu a uskladnite pri teplote -25 °C až -15 °C max. 30 dní.
11. Pokračujte sekvenovaním.
Viac informácií nájdete v *referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.

Interpretácia výsledkov

Výsledky sekvenovania z analýzy TSO Comprehensive (EU) sa vykazujú pre každú vzorku samostatne v správe vo formáte súboru PDF a JSON. Na úrovni vzorky sa taktiež generuje správa Low Depth Report (Správa z malej hĺbky sekvenovania) (`LowDepthReport.tsv`).

Na úrovni chodu sa generujú nasledujúce výstupné súbory:

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

V správach PDF a JSON sú uvedené iba varianty, ktoré úspešne absolvujú kontrolu kvality.

Podrobnejšie informácie o analýze nájdete v príručke k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661).

Výsledky pridruženej diagnostiky

Pre každý účel určenia pridruženej diagnostiky (CDx) existujú tri možné výsledky:

- Pozitívne – deteguje sa variant a je klasifikovaný na úrovni 1 (CDx).
- Bez detekcie – vo vzorke nie sú detegované žiadne varianty ani biomarkery súvisiace s účelom určenia CDx. Typ tumoru vybraný pre vzorku je vhodný na CDx.
- Bez výsledku – určenie stavu variantu nie je možné, a to najmenej z jedného nasledujúceho dôvodu:
 - Účel určenia CDx nebol vhodný pre testovanú vzorku, pretože typ vybraného tumoru pre vzorku je nevhodný z hľadiska typu tumoru pri diagnostike CDx.
 - Chod sekvenovania nespĺnil špecifikácie kontroly kvality.
 - Knižnica nespĺnila požadované špecifikácie kontroly kvality.
 - Vhodná nukleová kyselina sa nespracovala.

Výsledky všetkých účelov určenia diagnostiky CDx sú uvedené v časti Výsledky pridruženej diagnostiky v správe JSON. Časť Výsledky pridruženej diagnostiky v správe PDF obsahuje iba účely určenia s pozitívnym výsledkom.

Varianty s profilovaním tumoru

Test TSO Comprehensive (EU) je navrhnutý tak, aby vykazoval somatické varianty pri vykazovaní variantov s dôkazom klinického významu alebo variantov s potenciálnym klinickým významom. Analytický softvér TSO Comprehensive (EU) využíva databázu KB, ktorá určuje, či je každý detegovaný a spôsobilý variant ([Tabuľka 2](#)) klinicky významný alebo potenciálne klinicky významný na základe evidencie terapeutických, diagnostických alebo prognostických asociácií. Databáza KB zohľadňuje aj to, či sa stanovili (alebo nestanovili) asociácie pre testovaný typ tumoru. Asociácie náchylnosti alebo rizika rakoviny nie sú zahrnuté do databázy KB. Bežné polymorfizmy sa odstraňujú.

V prípade variantov na profilovanie tumoru sú pozitívne výsledky klasifikované ako genomické nálezy s dôkazom klinického významu alebo genomické nálezy s potenciálnym klinickým významom, a to podľa inštalovanej databázy KB a identifikovaného typu tumoru.

Zlyhania v oblasti kontroly kvality vedú k nulovým výsledkom pre typy variantov, ktoré sú relevantné vzhľadom na neúspešnú metriku kontroly kvality. Ďalšie informácie uvádza [Tabuľka 40](#) a [Tabuľka 41](#). Pozície profilovania tumoru s nedostatočnou hĺbkou sekvenovania sú uvedené v správe Low Depth Report – nie v správe TSO Comprehensive (EU).

Kontrola kvality

- Informácie o kvantifikácii nukleovej kyseliny a o minimálnych požiadavkách na vstupný materiál nájdete v časti [Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny na strane 27](#).
- Platnosť chodu sekvenovania a vzorky sa určuje automaticky a vykazuje ich analytický modul TSO Comprehensive (EU). Podrobnejšie informácie o analýze nájdete v príručke k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661).

Tabuľka 40 Metriky kontroly kvality v správe s výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU)

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Opis	Vplyv zlyhania špecifikácie*
Chod sekvenovania	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Percento čítaní, ktoré úspešne prešli filtrom (PF).	Chod sekvenovania stráca platnosť, nie sú vykazované žiadne výsledky pre žiadnu vzorku v chode.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Priemerné percento primárnych analýz báz so skóre kvality Q30 alebo vyšším pre čítanie 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Priemerné percento primárnych analýz báz so skóre kvality Q30 alebo vyšším pre čítanie 2.	

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Opis	Vplyv zlyhania špecifikácie*
Knižnice DNA	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 ALEBO > 3106 a hodnota P_VALUE $\leq 0,049$	Metrika hodnotiaca pravdepodobnosť kontaminácie použitím VAF bežných variantov. Skóre kontaminácie je založené na VAF distribúcii polymorfizmu SNP. Hodnota P kontaminácie sa zameriava na hodnotenie genómov s vysokou úrovňou preusporiadania – dá sa použiť iba vtedy, keď je skóre kontaminácie vyššie než je horný stanovený limit.	Nie sú vykazované žiadne výsledky DNA.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Mediánová dĺžka fragmentu vo vzorke.	Nie sú vykazované žiadne výsledky TMB ani malých variantov DNA.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (počet)	≥ 150	Mediánové pokrytie fragmentu exónu vo všetkých bázach exónu.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Percento báz exónu s 50× pokrytím fragmentu.	
	USABLE_MSI_SITES (počet)	≥ 40	Počet lokalít MSI použiteľných na stanovenie MSI (počet mikrosatelitných lokalít s dostatočným rozsahom čítaní na identifikáciu mikrosatelitnej nestability).	Nie sú vykazované žiadne výsledky MSI.
	COVERAGE_MAD (počet)	$\leq 0,210$	Medián absolútnych odchýlok od mediánu normalizovaného počtu každej cieľovej oblasti CNV.	Nie sú vykazované žiadne výsledky
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (počet)	$\geq 1,0$	Mediánový nespracovaný binárny počet na cieľ CNV.	amplifikácie génu.

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Opis	Vplyv zlyhania špecifikácie*
Knižnice RNA	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	$\geq 80,0$	Mediánová dĺžka fragmentu vo vzorke.	Výsledky fúzií ani variantov zostrihu sa nevykazujú.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeficient)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X je jednotkou jednotnosti pokrytia. Pre každý gén s pokrytím najmenej 500× sa počíta koeficient variácie v pokrytí tela génu. Táto metrika je mediánom týchto hodnôt. Vysoká hodnota indikuje vysokú úroveň variácie a problém s prípravou knižnice (napríklad nízke množstvo vstupnej vzorky alebo problémy s posunom sondy). Táto metrika sa počíta použitím všetkých čítaní (vrátane čítaní označených ako duplikáty).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (počet)	$\geq 9\,000\,000$	Celkový počet čítaní, ktoré sú mapované k cieľovým oblastiam. Táto metrika sa počíta použitím všetkých čítaní (vrátane čítaní označených ako duplikáty).	

* Úspešné výsledky sú označené ako PASS (Úspešné).

Tabuľka 41 Metriky kontrol správy s výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU)

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia	Vplyv zlyhania špecifikácie*
Pozitívna kontrola	Externá kontrola DNA	23 z 24 stanovených variantov bolo detegovaných	Manuálne zneplatnite vzorky pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky. Softvér analytického modulu nevykonáva automatické zneplatnenie vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky.
	Externá kontrola RNA	12 z 13 stanovených variantov bolo detegovaných	
Kontrola bez templátu	Mediánové pokrytie exónu DNA pre TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Manuálne zneplatnite vzorky pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky. Softvér analytického modulu nevykonáva automatické zneplatnenie vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky.
	Gén RNA nad hraničnou hodnotou mediánu	≤ 1	

* Úspešné výsledky sú označené ako PASS (Úspešné).

- Správa TSO Comprehensive (EU), ktorá je k dispozícii vo formátoch PDF a JSON, obsahuje súhrn výsledkov kontroly kvality. Správy sa nachádzajú v priečinku analýzy. Prečítajte si príručku k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661), v ktorej nájdete informácie o umiestnení analytického priečinka (obsahuje správy PDF a JSON), ako aj priečinka chodu.
- Chody sekvenovania, ktoré sú neplatné, opakujte.
- Opakujte testy knižníc s nasledujúcimi výsledkami:
 - Kontaminované knižnice DNA
 - Neplatné knižnice RNA
 - Testy je možné opakovať na získanie viacerých výsledkov variantu alebo biomarkera pre knižnice DNA, ktoré boli zneplatnené v dôsledku jedného, nie však všetkých typov variantov.
- Pozitívne kontroly sa hodnotia z hľadiska stanovenia (analýzy) variantu. Ak pozitívne kontroly nespĺňajú špecifikácie analýzy variantu, manuálne zneplatnite chod sekvenovania. Softvér analytického modulu nevykonáva automatické zneplatnenie vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky.
- NTC sa hodnotia z hľadiska mediánového pokrytia exónu pre DNA a gény nad mediánovou hraničnou hodnotou pre RNA. Ak negatívne kontroly nespĺňajú špecifikácie, manuálne zneplatnite udalosti prípravy knižnice a všetky chody sekvenovania. Softvér analytického modulu nevykonáva automatické zneplatnenie vzoriek pacienta na základe výsledkov kontrolnej vzorky.
- Vykonajte ďalšie roky kontroly kvality v súlade s miestnymi, štátnymi a federálnymi nariadeniami alebo požiadavkami na akreditáciu.

Ďalšie informácie o opakovaní chodov sekvenovania alebo testov knižníc nájdete v časti [Riešenie problémov na strane 85](#).

Riešenie problémov

Pomocou nasledujúcej tabuľky sa môžete pokúsiť vyriešiť prípadné problémy v rámci pracovného postupu. Ak chod sekvenovania alebo príprava knižnice na vzorku dvakrát zlyhá, môžu sa vyžadovať ďalšie opatrenia na riešenie problémov. Obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaný krok
Chod sekvenovania nevyhovuje špecifikáciám kontroly kvality	Chyba používania alebo laboratórneho vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy	Opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo laboratórneho vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému. <ul style="list-style-type: none"> • Opakujte sekvenovanie knižníc z platničky normalizovaných knižníc (NL) PCR. Prečítajte si časť Príprava na sekvenovanie na strane 75. • Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Prečítajte si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Prečítajte si časť Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA na strane 45 alebo Fragmentácia gDNA na strane 49.
	Problém s prístrojom	Obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.
Chyba počas generovania správy alebo všeobecná chyba prístroja (chyba siete, chyby počas vkladania a vykladania reagencií ap.)	Problém so softvérom alebo prístrojom	Pomocné informácie o generovaní správy nájdete v príručke k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument č. 200008661). Požiadajte o pomoc oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.
Knižnica DNA nespĺňa špecifikácie kontroly kvality	Požiadavky na vstup/zadanie vzorky neboli splnené	Zabezpečte vhodný vstup vzorky a opakujte prípravu knižnice počnúc krokom fragmentácie gDNA. Prečítajte si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny na strane 27 .

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaný krok
Knižnica DNA nespĺňa špecifikácie kontroly kvality (pokračovanie)	Chyba použitia alebo vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy	<p>Opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo laboratórneho vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Opakujte sekvenovanie knižníc z platničky normalizovaných knižníc (NL) PCR. Prečítajte si časť Príprava na sekvenovanie na strane 75. • Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Prečítajte si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Prečítajte si časť Fragmentácia gDNA na strane 49.
	Kritériá CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE nie sú splnené	<p>Prečítajte si varovania a preventívne opatrenia, v ktorých nájdete informácie o vyhnutí sa krížovej kontaminácii.</p> <p>Skontrolujte usporiadanie platničky a indexáciu knižnice a overte, či knižnice rovnakého indexu neboli spolu sekvenované.</p> <p>V prípade dotknutých knižníc spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Prečítajte si časť Fragmentácia gDNA na strane 49.</p> <p>Počas extrakcie vzorky mohlo dôjsť ku kontaminácii. Pravdepodobne budete musieť opakovať extrakciu a zaistiť, aby vzorka nebola kontaminovaná.</p>

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaný krok
	Použiteľné MSI zlyhalo	<p>Prečítajte si pokyny výrobcu ultrazvukového zariadenia týkajúce sa používania a prevádzky (vrátane hladiny vody a typu skúmaviek). Dbajte na vloženie/zadanie správnej vzorky do analýzy.</p> <p>Prečítajte si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny na strane 27.</p> <p>Ak je vzorka nadmerne fragmentovaná alebo poškodená, môže sa vyžadovať nová extrakcia vzorky alebo opakovanie kroku fragmentácie gDNA.</p>
	Vzorka môže byť nadmerne fragmentovaná alebo vykazovať poškodenie nukleovej kyseliny, ktoré ovplyvňuje schopnosť generovať dostatočne jedinečné knižnice	<p>Prečítajte si pokyny výrobcu ultrazvukového zariadenia týkajúce sa používania a prevádzky (vrátane hladiny vody a typu skúmaviek). Dbajte na vloženie/zadanie správnej vzorky do analýzy.</p> <p>Prečítajte si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny na strane 27.</p> <p>Ak je vzorka nadmerne fragmentovaná alebo poškodená, môže sa vyžadovať nová extrakcia vzorky alebo opakovanie kroku fragmentácie gDNA.</p>
Knižnica RNA nespĺňa špecifikácie kontroly kvality	Požiadavky na vstup/zadanie vzorky neboli splnené	<p>Zabezpečte vhodný vstup/zadanie vzorky a opakujte prípravu knižnice počnúc krokom denaturácie a hybridizácie RNA.</p> <p>Prečítajte si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny na strane 27.</p>

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaný krok
	Chyba použitia alebo vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy	<p>Opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo laboratórneho vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Opakujte sekvenovanie knižníc z platničky normalizovaných knižníc (NL) PCR. Prečítajte si časť Príprava na sekvenovanie na strane 75. • Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Prečítajte si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Prečítajte si časť Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA na strane 45.
	Vzorka môže byť nadmerne fragmentovaná alebo vykazovať poškodenie nukleovej kyseliny, ktoré ovplyvňuje schopnosť generovať dostatočne jedinečné knižnice	<p>Dbajte na vloženie/zadanie správnej vzorky. Prečítajte si časti Požiadavky na vzorky na strane 27 a Extrakcia, kvantifikácia a uchovávanie nukleovej kyseliny na strane 27.</p> <p>Ak je vzorka nadmerne fragmentovaná alebo poškodená, môže sa vyžadovať nová extrakcia vzorky.</p>

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčaný krok
Zlyhanie pozitívnej kontroly (DNA/RNA)	<p>Neboli splnené požiadavky na vstup vzorky, ktoré sa týkajú pozitívnej kontroly</p> <hr/> <p>Chyba použitia alebo vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy</p>	<p>Dbajte na vloženie/zadanie správnej vzorky do analýzy.</p> <p>Skontrolujte usporiadanie platničky a overte, či sa príslušné reagenty (sondy, indexy) nachádzajú v príslušných jamkách.</p> <p>Dbajte na to, aby bola pozitívna kontrolná vzorka uchovávaná podľa pokynov na štítku.</p> <p>Pokiaľ ide o všetky vzorky, ktoré používajú pozitívnu kontrolu, opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Opakujte sekvenovanie knižníc z platničky normalizovaných knižníc (NL) PCR. Prečítajte si časť Príprava na sekvenovanie na strane 75. • Znova obohaťte knižnice z platničky so vzorkami amplifikovaných knižníc (ALS) PCR. Prečítajte si časť Nastavenie prvej hybridizácie na strane 59. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Prečítajte si časť Denaturácia a hybridizácia (annealing) RNA na strane 45 alebo Fragmentácia gDNA na strane 49.
Zlyhanie NTC (DNA/RNA)	<p>Došlo ku krížovej kontaminácii alebo bola kontaminovaná pracovná oblasť</p> <hr/> <p>Nesprávna indexácia knižnice</p>	<p>Informácie o dekontaminácii pracovných oblastí nájdete v časti Varovania a preventívne opatrenia. Prečítajte si varovania a preventívne opatrenia, v ktorých nájdete informácie o vyhnutí sa krížovej kontaminácii.</p> <p>Skontrolujte usporiadanie platničky a indexáciu knižnice a overte, či knižnice rovnakého indexu neboli spolu sekvenované.</p> <p>Opakujte prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu v prípade všetkých knižníc, ktoré zdieľajú kontrolu bez templátu.</p>
Softvér indikuje, že do chodu sekvenovania neboli zahrnuté pozitívne alebo negatívne kontroly	Nesprávne priradenie typu tumoru v rámci plánovania chodu v aplikácii Local Run Manager	Znova vytvorte analytický front s kontrolami správne identifikovanými podľa príručky k pracovnému postupu analytického modulu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (číslo dokumentu 200008661).

Charakteristiky účinnosti

TSO Comprehensive (EU) je cieleň panel ngS s 517 génmi. Malé varianty DNA – jednodukleotidové varianty (SNV), viacnukleotidové varianty (MNV), inzercie a delécie sú vhodné na vykazovanie zo všetkých 517 génov. Amplifikácie génov sú vhodné na vykazovanie z génov MET a ERBB2. Fúzie sú vhodné na vykazovanie iba z 23 génov, ktoré uvádza [Analytický panel génov TSO Comprehensive \(EU\) na strane 2](#). Varianty zostrihu sú vhodné na vykazovanie z génov MET a EGFR. Aby ich bolo možné vykazovať, varianty musia byť detegované, musia byť uvedené v databáze KB analýzy TSO Comprehensive (EU) a musia byť vhodné na základe testovaného typu tkaniva. Aby ich bolo možné vykazovať, fúzie NTRK vyžadujú, aby bol partner fúzie 5' a doména NTRK kinázy bola intaktná.

V prípade malých variantov DNA bol použitý reprezentatívny prístup k validácii génov na paneli (údaje reprezentovali SNV, MNV, inzercie a delécie), na ktoré sa cieľi. V prípade amplifikácií génov, fúzií a variantov zostrihu sa testovanie uskutočnilo na úrovni génu. TMB a MSI boli hodnotené tam, kde boli indikované. Pokiaľ ide o predpoklady CDx fúzií NTRK, fúzie vo vzorkách FFPE boli testované v rámci štúdií zameraných na účinnosť špecifickú pre daný predpoklad (napríklad detekčný limit, presnosť v rámci laboratória, reprodukovateľnosť, správnosť a klinická účinnosť).

[Tabuľka 42](#) obsahuje definície metrík počítaných v rôznych štúdiách.

Tabuľka 42 Definície metrík

Výraz	Definícia
Percentuálna zhoda pozitívnych výsledkov (Positive Percent Agreement, PPA)	Percento pozitívnych výsledkov správne identifikovaných z celkového počtu pozitívnych výsledkov v porovnaní s ortogonálnou metódou.
Percentuálna zhoda negatívnych výsledkov (Negative Percent Agreement, NPA)	Percento negatívnych výsledkov správne identifikovaných z celkového počtu negatívnych výsledkov v porovnaní s ortogonálnou metódou.
Celková percentuálna zhoda (Overall Percentage Agreement, OPA)	Percento pozitívnych a negatívnych výsledkov správne identifikovaných z celkového počtu pozorovaní v porovnaní s ortogonálnou metódou.
Konkordancia s percentom pozitívnych výsledkov (Positive Percent Concordance, PPC)	Percento pozitívnych stanovení správne identifikovaných z celkového počtu pozitívnych výsledkov vzhľadom na riadiacu podmienku pri priamom párovom porovnávaní.
Konkordancia s percentom negatívnych výsledkov (Negative Percent Concordance, NPC)	Percento negatívnych stanovení správne identifikovaných z celkového počtu negatívnych výsledkov vzhľadom na riadiacu podmienku pri priamom párovom porovnávaní.
Percento pozitívnych stanovení (Positive Percent Call, PPC)	Percento pozorovaní, ktoré dávajú pozitívny výsledok vzhľadom na cieľ, z pozorovaní, u ktorých sa vzhľadom na cieľ pozitívny výsledok očakáva.
Percento negatívnych stanovení (Negative Percent Call, NPC)	Percento pozorovaní, ktoré dávajú negatívny výsledok vzhľadom na cieľ, z pozorovaní, u ktorých sa vzhľadom na cieľ negatívny výsledok očakáva.

Křížová kontaminácia

Uskutočnila sa štúdia krížovej kontaminácie na účely hodnotenia, či môže byť v dôsledku kontaminácie medzi jamkami počas prípravy knižnice alebo kontaminácie medzi po sebe nasledujúcimi chodmi sekvenovania v rámci analýzy TSO Comprehensive (EU) vykazovaný falošne pozitívny výsledok. Na hodnotenie krížovej kontaminácie boli použité dve vzorky DNA a dve vzorky RNA s jedinečnými a neprekrývajúcimi sa variantmi. Tridsaťdva knižníc DNA a 32 knižníc RNA bolo pripravených trikrát dvoma operátormi v rozložení šachovnice so striedaním vzoriek na hodnotenie kontaminácie medzi jamkami, a s alternatívnymi (striedavými) indexmi na hodnotenie kontaminácie medzi jednotlivými chodmi po sebe nasledujúcich sekvenovaní v rovnakom prístroji NextSeq 550Dx. Na hodnotenie krížovej kontaminácie boli hodnotené malé varianty DNA (ktoré ovplyvňujú aj TMB) a varianty RNA (MSI a génové amplifikácie neboli hodnotené). Štúdia krížovej kontaminácie vykazovala nulový podiel udalostí kontaminácie pozorovanej preskúmaním detegovaných variantov v každej vzorke, pričom neboli detegované žiadne falošne pozitívne výsledky.

Hodnotenie súpravy na extrakciu nukleovej kyseliny

Tri komerčne dostupné súpravy na extrakciu DNA a RNA boli hodnotené pomocou testu TSO Comprehensive (EU). Uvedené tri extrakčné súpravy izolovali DNA a RNA z rovnakých sekcií tkaniva FFPE. Súpravy sa odlišovali obsiahnutou látkou na deparafinizáciu a krokmi viazania nukleovej kyseliny ([Tabuľka 43](#)). Súprava 1 bola hlavnou extrakčnou súpravou použitou na stanovenie účinnosti testu TSO Comprehensive (EU).

Tabuľka 43 Charakteristiky súpravy

Súprava	Deparafinizačná látka	Viazanie nukleovej kyseliny
1	Vlastná	Stípec
2	Xylén	Stípec
3	Minerálny olej	Magnetické guľôčky

Sedem vzoriek (5 tkanivových vzoriek FFPE a 2 bunkové línie FFPE) bolo duplicitne extrahovaných 2 operátormi opakovane v priebehu 3 dní použitím každej z 3 extrakčných súprav (7 vzoriek × 3 extrakčné súpravy × 2 operátori na extrakciu × 3 dni extrakcie × 2 replikáty extrakcií).

[Tabuľka 44](#) obsahuje súhrn vplyvov extrakčných súprav na platnosť knižnice a stanovenie variantu. Pokiaľ ide o platnosť knižnice, najväčšie rozdiely medzi extrakčnými súpravami a ich význam stanovila kvantitatívna analýza metrick knižnice. Ak v prípade stanovenia variantu boli stredné hodnoty extrakčnej súpravy významne odlišné, vykazoval sa rozdiel.

Extrakčné súpravy boli hodnotené z hľadiska vplyvu na metriky platnosti knižnice pre malé varianty DNA/TMB a MSI. Metriky platnosti knižnice pre amplifikácie génu a RNA neboli medzi jednotlivými extrakčnými súpravami významne odlišné. Extrakčné súpravy neovplyvňovali stanovenie variantu v prípade malých variantov DNA a skóre TMB. Pokiaľ ide o skóre MSI a amplifikácie génov, neboli zistené žiadne falošne pozitívne výsledky a kvantitatívna analýza nenašla žiadne významné rozdiely v rámci negatívnych vzoriek. Zistilo sa, že extrakčné súpravy vykazujú odlišné hodnoty podporného čítania, čo znamená, že fúzie a varianty zostrihu v blízkosti limitu LoD môžu chýbať v dôsledku výberu extrakčnej súpravy.

Vybratú extrakčnú súpravu je potrebné použiť v rámci každého laboratórneho overenia charakteristík účinnosti testu TSO Comprehensive (EU) a na dosiahnutie primeranej platnosti knižnice.

Tabuľka 44 Vplyvy extrakčnej súpravy na platnosť knižnice a stanovenie variantu

Typ variantu	Miera platnosti knižníc (najväčší rozdiel)	Stanovenie variantu (najväčší rozdiel stredných hodnôt v základnej premennej)
Malé varianty DNA	Súprava 2 vykazuje významne nižšie hodnoty než súprava 3 (10 %)	Nevýznamné
TMB		Nevýznamné
MSI	Súprava 1 vykazuje významne nižšie hodnoty než súprava 3 (14 %)	Nezistili sa žiadne falošne pozitívne výsledky Falošne negatívne výsledky neboli hodnotené
Amplifikácia génu	Nevýznamné (5 %)	Nezistili sa žiadne falošne pozitívne výsledky Falošne negatívne výsledky neboli hodnotené
Fúzie	Nevýznamné (3 %)	Súprava 1 vykazovala významne nižšie hodnoty než súprava 3 (11 %)
Varianty zostrihu		Súprava 1 vykazovala významne nižšie hodnoty než súprava 3 (11 %)

Interferujúce látky

Vplyv potenciálnych endogénnych a exogénnych látok na účinnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) bol hodnotený na 16 jedinečných vzorkách FFPE z mozgu, štítnej žľazy, hrubého čreva, prsníka, pľúc, prostaty, pokožky a mäkkých typov tkaniva. Endogénne látky (melanín a hemoglobín) boli naočkované do vzoriek počas procesu extrakcie nukleovej kyseliny. Exogénne látky (etanol, xylén a proteínáza K) boli prítomné počas procesu extrakcie nukleovej kyseliny a boli naočkované aj do purifikovanej nukleovej kyseliny pred prípravou knižnice. Pridanie ďalšej proteínázy K počas procesu extrakcie bolo hodnotené aj v prípade, ak bola pozorovaná interferencia s naočkovanou proteínázou K. Pre každú zo 16 jedinečných vzoriek existovala nenačkovaná endogénna kontrola a pufer alebo exogénna kontrola s naočkovanou vodou. Vplyv nekrózy bol hodnotený na odlišnom súbore ôsmich vzoriek FFPE z pľúc, mozgu a tkaniva hrubého čreva. Pre každú nekrotickú vzorku existovala makrodisekovaná kontrola bez podielu nekrózy. V prípade všetkých interferujúcich látok boli analýzou TSO Comprehensive (EU) testované štyri replikáty na jednu vzorku a jednu látku a porovnané s príslušnou kontrolou na detekciu malých variantov DNA, amplifikácií génov, fúzií RNA a variantov zostrihu RNA, ako aj na účely určenia stavu MSI a skóre TMB.

Detekcia variantu DNA

Melanín (0,2 µg/ml), hemoglobín (2 mg/ml), etanol (5 %), proteínáza K (0,04 mg/ml) ani xylén (0,0001 %) nenarúšajú skóre TMB, stav MSI, malé varianty DNA ani amplifikácie génov.

Detekcia variantu RNA

Údaje potvrdzujú nulovú interferenciu hemoglobínu (2 mg/ml), melanínu (0,2 µg/ml), etanolu (5 %) a xylénu (0,0001 %) s fúziami RNA alebo variantmi zostrihu. Podobne nedochádzalo k žiadnej interferencii v prípade detekcie variantu RNA, keď bola pred prípravou knižnice do RNA naočkovaná proteináza K v koncentrácii 0,02 mg/ml a keď sa do vzorky počas procesu purifikácie pridalo max. 2,6 mg/ml proteinázy K.

Niektoré falošne pozitívne výsledky týkajúce sa neinterferujúcich kontrol boli pozorované medzi knižnicami replikátov pre fúzie RNA s hemoglobínom, melanínom, etanolom a xylénom, a v prípade variantov zostrihu s melanínom a xylénom. Podobne boli pozorované niektoré falošne negatívne výsledky v niektorých knižniciach replikátov pre varianty zostrihu RNA s hemoglobínom, melanínom, xylénom a 0,02 mg/ml proteinázou K. Vo všetkých prípadoch však boli falošne pozitívne a falošne negatívne výsledky priradené k problémom so vzorkami, pretože pozorovania detegovaných udalostí vykazovali podporné čítania v blízkosti limitu LoD. Preto boli falošne pozitívne a falošne negatívne výsledky v rámci replikátov považované za nesúvisiace s interferenciou a boli priradené k náhodnej odchýlke počtu podporných čítaní pre fúzie alebo varianty zostrihu na úrovni limitu LoD alebo pod ním.

Nekróza

Prítomnosť nekrotického tkaniva (až do výšky 70 %) neinterferuje so skóre TMB, stavom MSI, detekciou malých variantov DNA ani variantov zostrihu RNA. Detekcia fúzií RNA a amplifikácií génov je ovplyvnená vo vzorkách s $\geq 25\%$ nekrotického obsahu v tkanivovej oblasti. Ak časť vzorky obsahuje viac ako 25 % nekrózy v celkovej tkanivovej oblasti, nekrotické tkanivo je potrebné makrodisekovať.

Stabilita

Stabilita v reálnom čase

Stabilita v reálnom čase bola použitá na stanovenie doby skladovateľnosti súpravy analýzy TSO Comprehensive (EU) v prípade jej skladovania podľa podmienok uvádzaných na označení. Dizajn štúdie bol založený na testovaní 3 šarží reagensí a v rámci štúdie bol použitý klasický dizajn štúdie stability uvádzaný v dokumentácii CLSI EP25-A. Súpravy boli uskladnené vo finálnej konfigurácii súpravy po dobu trvania štúdie za podmienok skladovania uvádzaných na označení produktu. Zmrazené súčasti súpravy boli uskladnené pri teplote $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chladené súčasti súpravy boli uskladnené pri teplote $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Súčasti s izbovou teplotou boli uskladnené pri teplote $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Súpravy boli testované z hľadiska vzhľadu a plnenia funkčných požiadaviek v stanovených časových bodoch. Okrem toho boli analyzované stanovenie variantu a trendy metriky kontroly kvality vzorky pre materiál kontroly QC. Pre každú reagensiu bola stanovená doba skladovateľnosti. Dátumy expirácie sú priradené na základe dátumu výroby a doby skladovateľnosti. Exspirácia súpravy je priradená na základe reagensie, ktorej dátum expirácie uplynie ako prvý.

Stabilita súpravy počas používania

Stabilita analytickej súpravy TSO Comprehensive (EU) počas používania bola hodnotená v rámci štandardných podmienok používania v priebehu doby skladovateľnosti s cieľom overiť viaceré použitia súpravy. Súprava reagensí bola viackrát zmrazená/rozmrazená a testovaná pre až 4 použitia súpravy. Okrem toho bolo pripravených 8 knižníc RNA a 8 knižníc DNA, celkom 3-krát, na testovanie maximálneho možného počtu knižníc (24 knižníc DNA a 24 knižníc

RNA na jednu súpravu). Všetky funkčné kritériá súpravy boli splnené pre všetky testované cykly zmrazenia a rozmrazenia a časové body. Uskutočnilo sa testovanie vzoriek FFPE s reagensiami starými ≥ 25 mesiacov na účely hodnotenia vplyvu testovania stanovenia variantu počas používania. Kvalitatívna analýza variantov, na ktoré cieľ analýza, dokazuje, že udalosti počas používania neovplyvňovali stanovenie variantu.

Stabilita knižnice

Stabilita knižníc pripravených pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) bola hodnotená použitím 8 vzoriek FFPE DNA a 8 vzoriek FFPE RNA z 9 odlišných typov tkaniva testovaných v triplikátoch počas analýzy. Knižnice z platničky s normalizovanou knižnicou (NL) PCR boli združené a sekvenované v deň 0. Zvyšný objem knižníc na platničke NL PCR bol uchovávaný v zmrazenom stave (-25 °C až -15 °C), potom znova združený a sekvenovaný v deň 30. Všetky štatisticky významné výsledky pre malé varianty DNA medzi dňom 0 a 30 boli technicky zanedbateľné. Nevyskytli sa žiadne štatistické rozdiely medzi výsledkami dňa 0 a dňa 30, ktoré sa týkajú stavu MSI, skóre TMB, amplifikácií génov, fúzií RNA a variantov zostrihu RNA. Údaje indikujú, že knižnice generované z analýzy TSO Comprehensive (EU) sú stabilné až 30 dní pri teplote -25 °C až -15 °C .

Stabilita tkaniva FFPE upevneného na sklíčku

Stabilita tkanív FFPE upevnených na sklíčku, ktoré boli určené na analýzu pomocou testu TSO Comprehensive (EU), bola hodnotená formou rozdelenia blokov FFPE na sekcie ($5\text{ }\mu\text{m}$ sekcie) zo 16 jedinečných vzoriek predstavujúcich 9 typov tkaniva, s upevnením na sklíčku, s následným skladovaním pri izbovej teplote, vzhľadom na 3 časové body: 1. deň (kontrola), 4 týždne a 8 týždňov. Nukleové kyseliny (DNA aj RNA) boli extrahované v indikovanom časovom bode, potom zmrazené až do dokončenia extrakcií pre všetky časové body. Extrahovaná RNA bola uskladnená pri teplote -65 °C až -85 °C a extrahovaná DNA bola uskladnená pri teplote -25 °C až -15 °C . Pre každý časový bod boli testované tri replikáty na vzorku pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) a porovnané s kontrolou pre malé varianty DNA, stav MSI, skóre TMB, amplifikácie génov, fúzie RNA a varianty zostrihu RNA. Údaje indikujú, že tkanivá FFPE upevnené na sklíčkach, ktoré sú určené na analýzu pomocou testu TSO Comprehensive (EU), sú stabilné až 4 týždne.

Stanovenie ochranného pásma vstupnej titrácie nukleovej kyseliny

Vstup nukleovej kyseliny pre analýzu TSO Comprehensive (EU) bol hodnotený testovaním DNA z 33 vzoriek FFPE zahŕňajúcich 17 typov tkanív na vstupných úrovniach od 10 ng do 500 ng, a testovaním RNA z 5 vzoriek FFPE z 5 typov tkaniva na vstupných úrovniach od 10 ng do 85 ng. Hodnotili sa metriky kontroly kvality knižnice, ktoré záviseli od vzorky. Výsledky DNA preukázali, že metrika kontroly kvality niektorých (nie však všetkých) vzoriek DNA reagovala na vyššiu vstupnú hodnotu nad menovitou hodnotou vstupu 40 ng:

- Parameter MEDIAN_INSERT_SIZE nereagoval na vstup s hodnotou nad 30 ng.
- Parameter MEDIAN_EXON_COVERAGE vykazoval pozitívnu koreláciu vzhľadom na zvyšujúcu sa hodnotu vstupu.
- Hodnota parametra PCT_EXON_50X sa zvyšovala spolu s rastúcou hodnotou vstupu až do 80 ng.

- Hodnota parametra `USABLE_MSI_SITES` rástla spolu s rastúcou hodnotou vstupu. Niektoré vzorky s menej než 40 použiteľnými lokalitami MSI (`USABLE_MSI_SITES`) pri hodnote 40 ng splňali špecifikácie pri vyšších hodnotách vstupu, vďaka čomu bolo možné vypočítať skóre MSI.
- Hodnota parametra `MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET` rástla spolu s rastúcou hodnotou vstupu.
- Rastúca hodnota vstupu viedla k nárastu hodnoty parametra `COVERAGE_MAD` smerom k hornému limitu špecifikácie.

Metriky kontroly kvality vzorky RNA vzrástli (`MEDIAN_INSERT_SIZE` a `TOTAL_ON_TARGET_READS`) alebo sa znížili (`MEDIAN_CV_GENE_500X`) z 10 ng na 40 ng, vo všeobecnosti sa však v rozsahu vstupu 40 ng až 85 ng nemenili.

Limit blanku

Percento falošne pozitívnych výsledkov (spomedzi celkového počtu očakávaných negatívnych výsledkov) bolo hodnotené opakovaným testovaním normálneho alebo benígneho tkaniva FFPE, susediaceho tkaniva, ktoré by nemalo obsahovať somatické varianty pre malé varianty DNA, amplifikácie génov, MSI, fúzie RNA a varianty zostrihu RNA. Falošne pozitívne výsledky neboli hodnotené z hľadiska TMB, keďže v takomto prípade neexistuje žiadna klinická hraničná hodnota. Šesť vzoriek DNA a 6 vzoriek RNA FFPE bolo duplicitne analyzovaných 2 operátormi počas 3 dní, pre každú sa použili 2 šarže reagensí. Podmnožina vzoriek bola opätovne združená a opätovne sekvenovaná vo formáte „iba 3× DNA“ a „iba 3× RNA“ na účely hodnotenia falošne pozitívnych výsledkov v rámci niekoľkých multiplexných konfigurácií, ktoré dokáže toto zariadenie spracovať. Okrem toho bolo analyzovaných 30 ďalších vzoriek RNA v duplikátoch (použila sa 1 šarža reagensie a spracovanie vykonávali 2 operátori). Celkom existovalo 168 možných pozorovaní pre DNA a 228 možných pozorovaní pre RNA (hodnota bola znížená o neplatné knižnice pre každý typ variantu). Percento falošne pozitívnych výsledkov bolo počítané na úrovni génu (v prípade amplifikácií) a na úrovni pozície (približne 1,9 mil. pozícií) v prípade malých variantov DNA. Percento falošne pozitívnych výsledkov pre typy variantov DNA uvádza [Tabuľka 45](#). Percento falošne pozitívnych výsledkov pre fúzie RNA a varianty zostrihu dosahovalo hodnotu 0 % (pozri [Tabuľka 46](#)).

Tabuľka 45 Falošne pozitívne výsledky pre typ variantu DNA

Typ variantu	Falošne pozitívne
Amplifikácie génov	0 % (0/9912)
Malé varianty DNA	0,0001 % (271/295 801 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	N/A*

* Falošne pozitívne výsledky nie je možné použiť, pretože TMB sa vykazuje ako skóre a nemá kvantitatívny výsledok.

Tabuľka 46 Falošne pozitívne výsledky pre typ variantu RNA

Typ variantu	Falošne pozitívne
Fúzia	0 % (0/226)
Variant zostrihu	0 % (0/226)

Detekčný limit

Uskutočnili sa dve štúdie na účely hodnotenia detekčných limitov analýzy TSO Comprehensive (EU). Štúdia 1 hodnotila malé varianty DNA RET, fúzie RET a fúzie NTRK1 – 3. Štúdia 2 hodnotila ďalšie varianty s profilovaním tumoru.

Štúdia 1

Boli stanovené detekčné limity (LoD) NTRK1, NTRK3 a malých variantov RET DNA, ako aj NTRK1 – 3 a fúzií RET. Limit LoD je najnižšia hodnota analytu (napríklad frekvencia variantnej alely alebo podporné čítania), ktorú je možné konzistentne detegovať (detekčný limit 95 % alebo chyba typu II s hodnotou 5 %). V štúdii boli použité tkanivá FFPE s malými variantmi RET DNA (medulárna rakovina štítnej žľazy), fúziami RET (papilárna rakovina štítnej žľazy, atypický Spitzov tumor) – a fúziami NTRK1 – 3 (glióm nízkeho stupňa, multiformný glioblastóm, myofibroblastický sarkóm, sarkóm, rakovina prsných vylučovacích žliaz, rakovina hrubého čreva), ako aj bunková línia upravená s FFPE s malými variantmi NTRK1 a NTRK3 DNA. Každá vzorka bola zriedená najmenej na 5 testovacích úrovni (v rozsahu približne od 0,01 – 0,10 VAF pre malé varianty DNA a približne 2 – 25 podporných čítaní v prípade fúzií). Uskutočnilo sa 18 pozorovaní na každú testovaciu úroveň podľa šarže a variantu, generovaných 3 operátormi a 3 sekvenačnými prístrojmi na prípravu knižnice počas 3 po sebe nenasledujúcich dní s 2 replikátmi na každú úroveň testu vzorky. Uskutočnilo sa testovanie dvoch šarží reagensí.

V prípade variantov DNA sa analyzovali 2 šarže nezávislým spôsobom použitím regresie Probit alebo stanovením miery zhody (najnižšia úroveň testu s mierou zhody (bodový odhad) $\geq 95\%$) na určenie limitu LoD pre každý variant podľa šarže. Vyššia hodnota limitu LoD spomedzi dvoch šarží reagensí bola považovaná za detekčný limit variantu ([Tabuľka 47](#)).

V prípade fúzií RNA boli použité bunkové línie FFPE na odhadnutie hodnôt LoD pre každý gén fúzie. Limity LoD boli následne overené pomocou tkanív FFPE použitím duplicitných príprav knižnice 3 operátormi, v 3 prístrojoch a použitím 3 šarží reagensie na generovanie 54 pozorovaní na jeden variant v blízkosti limitu LoD stanoveného bunkovými líniami FFPE. Stanovené detekčné limity pre každú fúziu ([Tabuľka 48](#)) predstavujú najnižšie stredné podporné čítania, ktoré dosiahli mieru zhody (bodový odhad) $\geq 95\%$.

Tabuľka 47 Detekčný limit malých variantov DNA NTRK1, NTRK3 a RET

Marker	Pozícia	chromozómu	Referencia	Alternatíva	Detekčný limit (frekvencia variantnej alely)
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

Marker	Pozícia	chromozómu	Referencia	Alternatíva	Detekčný limit (frekvencia variantnej alely)
NTRK3 G696A (SNV)*	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (delécia)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

Chr = chromozóm

* Tieto varianty DNA boli analyzované pomocou regresnej analýzy Probit; ďalšie varianty DNA boli analyzované pomocou prístupu miery výskytu.

Tabuľka 48 Detekčný limit fúzií NTRK a RET

Gén	Fúzia	Detekčný limit (Podporné čítania)
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

Štúdia 2

Ukutočnilo sa hodnotenie detekčných limitov (LoDs) pre varianty s profilovaním tumoru vykazovaných analýzou TSO Comprehensive (EU). Limit LoD je najnižšia hodnota analytu (frekvencia variantnej alely, násobná zmena alebo podporné čítania), ktorú je možné konzistentne detegovať (miera zhody 95 % alebo chyba typu II s hodnotou 5 %). Vzorky FFPE zo 17 typov tkaniva obsahujúce varianty boli zriedené na rôzne testovacie úrovne. Bolo generovaných šesť pozorovaní na jednu úroveň (dva operátori, každý z nich používal odlišnú šaržu reagentie a prístroj).

Varianty DNA

Určili sa detekčné limity LoDs 10 malých variantov DNA (celkovo 25 variantov) a 2 génové amplifikácie DNA (ERBB2 a MET) a sumarizovali ako rozsahy (Tabuľka 49). Súčasťou boli aj varianty RET z LoD štúdie 1. Dve z 3 inzercíí, ktorých veľkosť presiahla 5 bp, mali hodnotu LoD 0,034 a 0,036 VAF, tretia dosiahla hodnotu LoD 0,215 VAF. Posledná zo spomínaných bola inzerciou v oblasti s nízkou komplexnosťou, v ktorej inzercia pridá ďalšie opakovania, ovplyvní zarovnávanie a vyžaduje vytvorenie viacerých čítaní, aby bolo výsledkom konzistentné detegovanie. Vzhľadom na to môžu genomické kontexty s nízkou komplexnosťou ovplyvňovať detegovanie inzercíí s veľkosťou >5 bp.

Tabuľka 49 Detekčný limit pre malé varianty DNA a amplifikácie génov

Typ (merná jednotka LoD)	Trieda variantu/genomický kontext	Počet variantov	Rozsah
Malé varianty DNA (frekvencia variantnej alely)	SNV	5	0,016 – 0,064
	MNV	3	0,022 – 0,048
	Inzercia (1 – 2 bp) v blízkosti homopolymérových opakovaní	2	0,086 – 0,104
	Inzercia (1 – 2 bp) v blízkosti dinukleotidových opakovaní	2	0,038 – 0,051
	Inzercia (3 – 5 bp)	2	0,030 – 0,056
	Inzercia (> 5 bp a max. 25 bp)	3	0,034 – 0,215
	Delécia (1 – 2 bp) v blízkosti homopolymérových opakovaní	2	0,094 – 0,100
	Delécia (1 – 2 bp) v blízkosti dinukleotidových opakovaní	2	0,033 – 0,070
	Delécia (3 – 5 bp)	2	0,028 – 0,064
	Delécia (> 5 s max. 25 bp)	2	0,047 – 0,055
Amplifikácie génov (násobná zmena)	Podľa génu (ERBB2, MET)	2	2,034 – 2,195

Fúzie

Limity LoD boli stanovené pre 18 fúzií zahŕňajúcich 20 génov na paneli TSO Comprehensive (EU), ktorých rozsah podporných čítaní dosahoval 10 až 54,7 (Tabuľka 50). Ďalšie 3 gény (NTRK1– 3) boli testované v inej štúdii. Gén RET bol testovaný v rámci tejto, ako aj v ďalšej štúdii limitu LoD. Šestnásť fúzií so stanoveným limitom LoD vykazovalo údaje konzistentné s bežným limitom LoD 16 podporných čítaní použitím obojstranného horného limitu spoľahlivosti 95 % (UCL). Dve fúzie vykazovali limit LoD s hodnotami 24,7 a 44,2 podporného čítania, ktoré neboli konzistentné s bežným limitom LoD.

Fúzia FGFR2-SRPK2 s hodnotou LoD 24,7 podporného čítania vykazovala podľa anotácií analytického softvéru TSO Comprehensive (EU) oblasti opakovaného presahu v bode zlomu. Opakované oblasti v rámci bodu zlomu obvykle predstavujú nižšiu úroveň evidencie, keďže čítania sa môžu mapovať kdekoľvek v genóme alebo môžu ostať nezarovnané. Oblasti opakovania okrem toho zvyšujú náročnosť spracovania zostavy (používanej na identifikáciu sekvencií fúzie) a vyžadujú ďalšie dôkazy na vytvorenie správnej sekvencie. SEPT14-EGFR je ďalším príkladom fúzie s homológnu sekvenciou v bode zlomu.

Fúzia BCL2-IGHJ5 s hodnotou LoD 44,2 podporných čítaní vykazovala veľmi krátky gén (IGHJ5) s bodom zlomu v blízkosti začiatku exónu, v dôsledku čoho sa vyžadovali prerušené krátke zarovnania. Výsledkom bol vyšší požadovaný počet čítaní na dosiahnutie konzistentnej detekcie.

Tabuľka 50 Detekčný limit fúzií

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

Variety zostrihu

2 varianty zostrihu RNA – MET a EGFR – vykazovali limit LoD s hodnotou 18,7 a 24,8 podporných čítaní (podľa poradia).

Obsah tumoru

Výsledky štúdie obsahujú odporúčania týkajúce sa obsahu tumoru v klinických vzorkách. Vo všeobecnosti platí, že čím je vyšší obsah tumoru, tým je vyšší „signál“ (VAF, násobná zmena alebo podporné čítania) pre varianty v tumore. Minimálne odporúčania týkajúce sa obsahu tumoru vychádzajú z nasledujúcich zistení. Hodnoty limitu LoD pre malé varianty DNA dosahujú max. hodnotu 0,104 VAF (s výnimkou inzerie TP53). S cieľom detegovať mutácie, ktoré pôsobia ako faktor stimulujúci vznik tumoru (frekvencia variantnej alely 0,50), sa odporúča 20 % obsah tumoru, aby tieto mutácie dosiahli 0,10 hodnotu VAF a nachádzali sa na úrovni limitu LoD alebo nad ňou. V prípade 20 % obsahu tumoru budú tie gény, ktoré sú amplifikované na 5,5-násobnú zmenu (11 kópií), konzistentne detegované na základe detekčného limitu 1,8-násobnej zmeny. V prípade 20 % obsahu tumoru budú fúzie s 80 podpornými čítaniami konzistentne detegované na základe detekčného limitu 16 podporných čítaní.

Reprodukovateľnosť

Uskutočnili sa dve štúdie zamerané na hodnotenie reprodukovateľnosti na analýzu TSO Comprehensive (EU). Štúdia 1 hodnotila malé varianty RET DNA, ako aj varianty fúzie NTRK a RET. Štúdia 2 hodnotila ďalšie varianty s profilovaním tumoru.

Štúdia 1

Táto štúdia sa uskutočnila na účely hodnotenia reprodukovateľnosti analýzy TSO Comprehensive (EU) v 3 testovacích lokalitách (1 interná, 2 externé) s 2 operátormi na lokalitu, 2 replikátmi v rámci chodu a počas 3 po sebe nenasledujúcich testovacích dní. Testovanie sa uskutočnilo použitím panela reprodukovateľnosti obsahujúceho vzorky DNA so špecifickými známymi malými variantmi RET DNA a vzorky RNA obsahujúce špecifické známe varianty fúzií NTRK1 – 3 a RET z tkanivových vzoriek fixovaných vo formalíne a zaliatych v parafíne (FFPE), ako aj bunkových línií. Tento panel obsahoval členy panela DNA a RNA s variantami na nízkej a vysokej úrovni s rovnakým počtom členov panela na nízkej a vysokej úrovni pre každú triedu variantu. Členy panela na vysokej úrovni boli cieľom, ak dosiahli približne na 2 až 3-násobok limitu LoD, a členy panela na nízkej úrovni boli cieľom približne na úrovni limitu LoD. V každej lokalite operátor testoval členy panela duplicitne 3-krát, výsledkom bolo 6 pozorovaní na cieľ a člen panela. Zo všetkých 3 lokalít bolo generovaných 36 pozorovaní na člen panela (3 lokality/prístroje × 2 operátori × 2 replikáty v rámci chodu × 3 dni spustenia).

Percento pozitívnych stanovení (PPC) a percento negatívnych stanovení (PNC) malých variantov DNA a variantov fúzií RNA na vysokej úrovni, na ktoré cieľila analýza, sa určili ako primárne koncové body. PPC a PNC malých variantov DNA a variantov fúzií RNA na nízkej úrovni, na ktoré cieľila analýza, boli počítané ako sekundárne koncové body. Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti (CI) súvisiace so všetkými koncovými bodmi boli počítané pomocou Wilsonovej metódy skóre. Uskutočnili sa primárne analýzy na účely odhadnutia PPC a PNC (s priradenými intervalmi CI 95 %) v členoch panela na vysokej úrovni, na ktoré cieľila analýza, formou kombinácie pozorovaní analýzy TSO Comprehensive (EU) daného cieľa v skupine členov panela predstavujúcich príslušnú triedu variantu (napríklad malé varianty DNA a fúzie RNA) v rámci lokalít/prístrojov, operátorov a chodov.

Pre každý variant, na ktorý cieľila analýza, sa do vypočítanej hodnoty PNC začlenili pozorovania analýzy TSO Comprehensive (EU) iných členoch panela na vysokej úrovni, pre ktoré sa zisťoval rovnaký typ variantu, ale bez obsahu rovnakého variantu, ktorý stanovuje pravidlo väčšiny. Celkové hodnoty PPC a PNC pre členy panela na nízkej úrovni, na ktoré cieľila analýza, boli stanovené podobným spôsobom.

Malé varianty RET DNA

Pokiaľ ide o členy panela malých variantov DNA na vysokej úrovni, celková hodnota PPC dosiahla 100,0 % (207/207; 95 % interval CI: 98,2 % až 100,0 %) (Tabuľka 51). Celková hodnota PNC členov panela malého variantu DNA na vysokej úrovni dosiahla 100,0 % (1035/1035; 95 % interval CI: 99,6 % až 100,0 %) (Tabuľka 52). Pokiaľ ide o členy panela malých variantov DNA na nízkej úrovni, na ktoré celi analýza, celková hodnota PPC pre členov panela malých variantov DNA na nízkej úrovni, na ktoré celi analýza, dosiahla 99,1 % (210/212; 95 % interval CI: 96,6 % až 99,7 %) a celková hodnota PNC dosiahla 100,0 % (1026/1026; 95 % interval CI: 99,6 % až 100,0 %).

Tabuľka 51 Hodnota PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu malých variantov RET DNA v členoch panela na vysokej a nízkej úrovni, na ktoré celi analýza

Úroveň variantu	Typ variantu	Variant, na ktorý cieľila analýza (Nukleotid)	Variant, na ktorý cieľila analýza (Aminokyselina)	n	Stredná hodnota VAF	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI*
Vysoká	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Vysoká	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Vysoká	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Vysoká	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Vysoká	Delécia	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Vysoká	Inzercia	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	207	Nevzťahuje sa	100,0 % (207/207)	(98,2 %, 100,0 %)

Úroveň variantu	Typ variantu	Variant, na ktorý cieľila analýza (Nukleotid)	Variant, na ktorý cieľila analýza (Aminokyselina)	n	Stredná hodnota VAF	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI*
Nízka	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Nízka	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 % (33/35)	(81,4 %, 98,4 %)
Nízka	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Nízka	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Nízka	Delécia	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Nízka	Inzercia	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	212	Nevzťahuje sa	99,1 % (210/212)	(96,6 %, 99,7 %)

Skratky: N/A – nevzťahuje sa; VAF – frekvencia variantnej alely.

* Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Tabuľka 52 Hodnota PNC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu malých variantov RET DNA v cieľných členoch panela vysokej a nízkej úrovne

Úroveň variantu	Typ variantu	Variant, na ktorý cieľila analýza (Nukleotid)	Variant, na ktorý cieľila analýza (Aminokyselina)	n ¹	Percento negatívnych stanovení (%)	95 % interval CI ²
Vysoká	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 % (173/173)	(97,8 %, 100,0 %)
Vysoká	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Vysoká	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Vysoká	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 % (172/172)	(97,8 %, 100,0 %)
Vysoká	Delécia	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Vysoká	Inzercia	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	Všetky malé varianty DNA – vysoká	1035	100,0 % (1035/1035)	(99,6 %, 100,0 %)
Nízka	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 % (177/177)	(97,9 %, 100,0 %)
Nízka	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 % (143/143)	(97,4 %, 100,0 %)
Nízka	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Nízka	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)

Úroveň variantu	Typ variantu	Variant, na ktorý cieľila analýza (Nukleotid)	Variant, na ktorý cieľila analýza (Aminokyselina)	n ¹	Percento negatívnych stanovení (%)	95 % interval CI ²
Nízka	Delécia	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 % (178/178)	(97,9 %, 100,0 %)
Nízka	Inzercia	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	Všetky malé varianty DNA – nízka	1026	100,0 % (1026/1026)	(99,6 %, 100,0 %)

¹ Všetky pozorovania združené z kombinácií variantov členov panela, pri ktorých je väčšina stanovení negatívna, t. j. varianty, na ktoré cieľila analýza, obsahujúce fúzie s menej než 50 % pozitívnych stanovení.

² Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Tabuľka 53 uvádza analýzu komponentov variácie frekvencií variantných alel (VAF) v rámci približne 36 pozorovaní pre každý člen panela. Štandardná odchýlka (SD) a percentuálny koeficient variácie (% CV; celkom a pre každý zdroj) boli počítané a prezentované pre každý cieľný malý variant RET DNA.

Tabuľka 53 Analýza komponentov variácie TSO Comprehensive (EU) VAF v členoch panela malých variantov DNA, na ktoré cieľila analýza

Úroveň variantu	Typ variantu	Variant, na ktorý cieľila analýza (Nukleotid)	Variant, na ktorý cieľila analýza (Aminokyselina)	n	Stredná hodnota VAF	SD lokality (% CV)	Operátor SD (% CV)	SD dňa (% CV)	SD replikátu (% CV)	Celková SD (% CV)
Vysoká	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 %)
Vysoká	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 %)
Vysoká	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 %)
Vysoká	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 %)
Vysoká	Delécia	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 %)
Vysoká	Inzercia	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0 %)	0,000 (0,0 %)	0,000 (0,0 %)	0,009 (9,6 %)	0,010 (10,1 %)
Nízka	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 %)
Nízka	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 %)
Nízka	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 %)

Úroveň variantu	Typ variantu	Variant, na ktorý cielila analýza (Nukleotid)	Variant, na ktorý cielila analýza (Aminokyselina)	n	Stredná hodnota VAF	SD lokality (% CV)	Operátor SD (% CV)	SD dňa (% CV)	SD replikátu (% CV)	Celková SD (% CV)
Nízka	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 %)
Nízka	Delécia	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 %)
Nízka	Inzercia	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 %)

Fúzie NTRK 1 – 3 a RET

V prípade členov panela fúzií RNA na vysokej úrovni bola celková hodnota PPC 99,3 % (285/287; 95 % interval CI: 97,5 % až 99,8 %) (Tabuľka 54). Hodnota PPC bola 100 % pre všetky členy panela na vysokej úrovni okrem člena panela BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % interval CI: 81,9 % až 98,5 %]). Celková hodnota PNC pre členy panela fúzie RNA na vysokej úrovni dosiahla 100,0 % (1724/1724; 95 % interval CI: 99,8 % až 100,0 %) (Tabuľka 55). Pokiaľ ide o členy panela fúzií RNA na nízkej úrovni, na ktoré cieľila analýza, celková hodnota PPC dosiahla 95,4 % (272/285; 95 % interval CI: 92,3 %, 97,3 %) a celková hodnota PNC 100,0 % (1851/1851; 95 % interval CI: 99,8 % až 100,0 %).

Tabuľka 54 Hodnota PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu fúzií NTRK a RET v členoch panela na vysokej a nízkej úrovni, na ktoré cieľila analýza

Úroveň variantu	Fúzia, na ktorú cieľila analýza	n	Stredná hodnota podporných čítaní	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI*
Vysoká	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Vysoká	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 % (34/36)	(81,9 %, 98,5 %)
Vysoká	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Vysoká	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Vysoká	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Vysoká	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Vysoká	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Vysoká	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Vysoká	Všetky fúzie vysoké	287	36,5	99,3 % (285/287)	(97,5 %, 99,8 %)
Nízka	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 % (34/36)	(81,9 %, 98,5 %)
Nízka	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 % (29/36)	(65,0 %, 90,2 %)

Úroveň variantu	Fúzia, na ktorú cieľila analýza	n	Stredná hodnota podporných čítaní	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI*
Nízka	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 % (33/35)	(81,4 %, 98,4 %)
Nízka	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Nízka	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Nízka	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Nízka	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 % (35/36)	(85,8 %, 99,5 %)
Nízka	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 % (33/34)	(85,1 %, 99,5 %)
Nízka	Všetky fúzie nízke	285	16,8	95,4 % (272/285)	(92,3 %, 97,3 %)

* Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti (CI) vypočítané pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Tabuľka 55 Hodnota PNC analýzy TSO Comprehensive (EU) na detekciu fúzií NTRK a RET na vysokej a nízkej úrovni, na ktoré necieľila analýza

Úroveň variantu	Fúzie, na ktoré cieľila analýza	n ¹	Percento negatívnych stanovení (%)	95 % interval CI ²
Vysoká	LMNA-NTRK1	180	100,0 % (180/180)	(97,9 %, 100,0 %)
Vysoká	BCAN-NTRK1	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Vysoká	ETV6-NTRK2	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Vysoká	TRIM24-NTRK2	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Vysoká	ETV6-NTRK3	144	100,0 % (144/144)	(97,4 %, 100,0 %)
Vysoká	BTBD1-NTRK3	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Vysoká	NCOA4-RET	215	100,0 % (215/215)	(98,2 %, 100,0 %)

Úroveň variantu	Fúzie, na ktoré cielila analýza	n ¹	Percento negatívnych stanovení (%)	95 % interval CI ²
Vysoká	CCDC6-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Vysoká	Všetky fúzie – vysoké	1724	100,0 % (1724/1724)	(99,8 %, 100,0 %)
Nízka	LMNA-NTRK1	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)
Nízka	BCAN-NTRK1	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Nízka	ETV6-NTRK2	250	100,0 % (250/250)	(98,5 %, 100,0 %)
Nízka	STRN-NTRK2	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Nízka	ETV6-NTRK3	177	100,0 % (177/177)	(97,9 %, 100,0 %)
Nízka	BTBD1-NTRK3	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Nízka	NCOA4-RET	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)
Nízka	KIF5B-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Nízka	Všetky fúzie – nízke	1851	100,0 % (1851/1851)	(99,8 %, 100,0 %)

¹ Všetky pozorovania združené z kombinácií variantov členov panela, pri ktorých je väčšina stanovení negatívna, t. j. varianty, na ktoré cielila analýza, obsahujúce fúzie s menej než 50 % pozitívnych stanovení.

² Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Tabuľka 56 uvádza analýzu komponentov variácie podporných čítaní v rámci približne 36 pozorovaní v každej fúzii, na ktorú cielila analýza. Hodnoty SD a % CV (celkom a pre každý zdroj) boli počítané a prezentované pre každú fúziu, na ktorú cielila analýza.

Tabuľka 56 Analýza komponentov variancie analýzy TSO Comprehensive (EU) podporných čítaní v členoch panela fúzie RNA, na ktorú cieľila analýza

Úroveň variantu	Fúzia	n	Stredná hodnota podporných čítaní	SD lokality (% CV)	SD operátora (% CV)	SD dňa (% CV)	SD replikátu (% CV)	Celková SD (% CV)
Vysoká	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9 %)	3,37 (9 %)	6,93 (18 %)	9,04 (24 %)	12,39 (33 %)
Vysoká	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41 %)	7,87 (23 %)	5,40 (16 %)	8,95 (27 %)	18,98 (57 %)
Vysoká	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33 %)	3,50 (14 %)	4,20 (17 %)	4,86 (20 %)	10,86 (44 %)
Vysoká	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31 %)	4,24 (12 %)	6,82 (19 %)	6,87 (19 %)	15,57 (43 %)
Vysoká	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20 %)	10,20 (18 %)	9,25 (16 %)	8,69 (15 %)	19,93 (35 %)
Vysoká	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5 %)	2,65 (8 %)	2,16 (7 %)	10,47 (32 %)	11,11 (34 %)
Vysoká	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13 %)	4,09 (11 %)	6,17 (17 %)	5,20 (14 %)	10,17 (28 %)
Vysoká	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22 %)	2,56 (8 %)	6,53 (20 %)	5,51 (16 %)	11,49 (34 %)
Nízka	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13 %)	0,00 (0 %)	2,74 (20 %)	4,37 (32 %)	5,47 (40 %)
Nízka	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17 %)	2,98 (18 %)	4,61 (27 %)	5,82 (34 %)	8,52 (50 %)
Nízka	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0 %)	3,41 (22 %)	3,83 (25 %)	4,39 (29 %)	6,75 (45 %)
Nízka	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13 %)	0,61 (5 %)	2,33 (17 %)	2,57 (19 %)	3,95 (29 %)
Nízka	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24 %)	3,46 (14 %)	0,00 (0 %)	6,39 (26 %)	9,44 (38 %)
Nízka	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	6,64 (37 %)	6,71 (37 %)
Nízka	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13 %)	1,03 (7 %)	0,00 (0 %)	5,11 (32 %)	5,61 (36 %)

Úroveň variantu	Fúzia	n	Stredná hodnota podporných čítaní	SD lokality (% CV)	SD operátora (% CV)	SD dňa (% CV)	SD replikátu (% CV)	Celková SD (% CV)
Nízka	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12 %)	0,00 (0 %)	1,58 (10 %)	5,83 (35 %)	6,39 (39 %)

% CV: Percento koeficientu variácie (odchýlky).

SD: Štandardná odchýlka.

Štúdia 2

Uskutočnila sa druhá štúdia na účely hodnotenia reprodukovateľnosti analýzy TSO Comprehensive (EU) v rámci 3 testovacích lokalít (2 externé a 1 interná), pomocou 2 operátorov/prístrojov na lokalitu, 3 jedinečných šarží reagentie, počas 4 testovacích dní (nenasledujúcich po sebe) a 2 chodov sekvenovania na knižnicu vzoriek.

Testovanie sa uskutočnilo pomocou vzoriek extrahovanej DNA a RNA zo 41 vzoriek tkaniva FFPE a 1 bunkového radu FFPE (s 1 tkanivovou vzorkou FFPE a bunkovou líniou FFPE použitou na 2 členy panela). Išlo o nasledujúce typy tkanivových vzoriek: močový mechúr, kosti, mozog, prsník, hrubé črevo, stredná časť tenkého čreva, obličky, pľúca, vaječníky, prostata, pokožka, mäkké tkanivo, žalúdok, štítna žľaza a maternica. Bolo testovaných celkom 44 členov panela vrátane členov panela DNA s malými variantmi DNA (SNV, MNV, inzercie a delécie), amplifikácií génov, rôznych skóre TMB, vysokých skóre MSI a členov panela RNA s génovými fúziami a variantmi zostrihu. Väčšina členov panela vykazovala známe cieľové varianty na úrovniach približne 2 až 3-násobku detekčného limitu špecifického pre variant (2 – 3× LoD).

Limit LOD je koncentrácia analytu, pri ktorej sú pozorované výsledky analýzy pozitívne (detegovaný variant vzhľadom na hraničnú hodnotu analýzy TSO Comprehensive (EU)) ≥ 95 % času. Stredné pozorované úrovne variantu boli kategorizované približne na úrovni $<2 \times \text{LOD}$ (observed variant levels at $< 1.5 \times \text{LOD}$), $\sim 2-3 \times \text{LOD}$ (observed variant levels at $1.5 \times \text{LOD}$ to $3.4 \times \text{LOD}$), and approximately >3 -násobku limitu LOD (pozorované úrovne variantu na úrovni $> 3,4$ -násobku limitu LOD).

Percento pozitívnych stanovení (PPC) pre malé varianty DNA, amplifikácie génov, varianty s vysokým podielom MSI (MSI-H) a varianty RNA boli počítané formou kombinácie pozorovaní v rámci chodov sekvenovania a lokalít. Percento negatívnych stanovení (PNC) bolo podobným spôsobom počítané pre malé varianty DNA, amplifikácie génov a varianty RNA. Pre každý známy cieľový variant boli pozorovania z analýzy TSO Comprehensive (EU) u členov panela rovnakého typu variantu, ale obsahujúcich odlišné varianty neodvodené z rovnakej zdrojovej vzorky a nespĺňajúce pravidlo väčšiny pre daný variant (t. j. < 50 % stanovení bolo pozitívnych) skombinované v rámci lokalít, operátorov/prístrojov, dní, šarží reagentií a chodov sekvenovania na účely výpočtu PNC. Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Malé varianty DNA

Tabuľka 57 uvádza PPC pre ciele malé varianty DNA. Hodnoty PPC dosahovali od 91,3 % (BRAF SNV) do 100 % v prípade väčšiny malých variantov DNA.

Tabuľka 57 PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) pri detekcii malých variantov DNA v kombinovaných členoch panela, na ktoré cieľila analýza

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Typ variantu	Variant (nukleotid), na ktorý cieľila analýza	Variant (aminokyselina), na ktorý cieľila analýza	Stredná hodnota VAF ²	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI ³
Približne 2 – 3× limit LOD	DELÉCIA	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 % (28/28)	(87,9 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	DELÉCIA	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 % (40/40)	(91,2 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	INZERCIA	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 % (32/32)	(89,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	INZERCIA	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2 × LOD	INZERCIA	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 % (4/4)	(51,0 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 % (42/46)	(79,7 %, 96,6 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	DELÉCIA	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	DELÉCIA	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	INZERCIA	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0,075	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Typ variantu	Variant (nukleotid), na ktorý cieľila analýza	Variant (aminokyselina), na ktorý cieľila analýza	Stredná hodnota VAF ²	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI ³
Približne 2 – 3× limit LOD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	INZERCIA	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	DELÉCIA	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
<2 × LOD	INZERCIA	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0,157	100,0 % (2/2)	(34,2 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	INZERCIA	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

¹ Úroveň variantu počítaná zo strednej pozorovanej frekvencie variantnej alely.

² Stredná frekvencia variantnej alely počítaná z pozorovaných výsledkov analýzy.

³ Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Hodnoty PNC dosiahli pri malých variantoch DNA 100 %.

Tabuľka 58 uvádza analýzu komponentov variancie pre výsledky VAF pre každý zdroj odchýlky a celkovú odchýlku vo všetkých členoch panela s malými variantmi DNA, na ktoré cieľila analýza.

Tabuľka 58 Analýza komponentov variancie VAF pre malé varianty DNA, na ktoré cieľila analýza

Variant, na ktorý cieľila analýza	N	Stredná hodnota VAF	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokality) (% CV)	SD dňa (lokality, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)

Variant, na ktorý cieľila analýza	N	Stredná hodnota VAF	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokality) (% CV)	SD dňa (lokality, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	46	0,112	0,000 (0,0)	0,004 (3,8)	0,015 (13,7)	0,005 (4,1)	0,008 (6,9)	0,018 (16,3)
chr7_55259515_T_G	38	0,045	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,012 (27,3)	0,000 (0,0)	0,003 (6,8)	0,013 (28,8)
chr7_140453136_A_T	46	0,045	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,016 (34,9)	0,000 (0,0)	0,006 (12,2)	0,017 (36,9)
chr7_140453136_AC_TT	46	0,130	0,000 (0,0)	0,004 (2,9)	0,017 (13,4)	0,003 (2,6)	0,006 (4,9)	0,019 (14,8)
chr9_139399350_C_CG	48	0,146	0,015 (10,2)	0,000 (0,0)	0,012 (8,2)	0,000 (0,0)	0,004 (2,8)	0,020 (13,4)
chr10_89720798_GTACT_G	44	0,157	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,021 (13,6)	0,002 (1,6)	0,010 (6,4)	0,024 (15,3)
chr12_25398284_CC_AT	38	0,111	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (16,8)	0,003 (2,5)	0,008 (7,3)	0,020 (18,5)
chr17_7574002_CG_C	44	0,158	0,007 (4,2)	0,000 (0,0)	0,021 (13,5)	0,013 (8,6)	0,013 (8,2)	0,029 (18,4)
chr17_7574029_C_CGGAT	48	0,154	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (11,0)	0,006 (3,8)	0,010 (6,6)	0,021 (13,4)
chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	36	0,075	0,013 (16,9)	0,006 (8,1)	0,013 (16,7)	0,000 (0,0)	0,004 (4,7)	0,019 (25,5)
chr22_41574678_GC_G	44	0,245	0,006 (2,4)	0,002 (0,6)	0,019 (7,9)	0,000 (0,0)	0,005 (2,1)	0,021 (8,6)

Existovali dva malé varianty DNA, na ktoré cieľila analýza a v súvislosti s ktorými bol počet pozorovaní príliš nízky na prispôbenie modelu komponentov variancie. Pre tieto dva varianty, na ktoré cieľila analýza, dosahovala celková hodnota SD 0,027 (variant chr1_27024001_C_CG) a 0,001 (variant chr17_7578470_C_CGGGCGG).

Amplifikácie génov

Tabuľka 59 uvádza PPC pre amplifikácie génov, na ktoré cieľila analýza. Hodnoty PPC dosiahli 100,0 % v prípade MET a 100,0 % v prípade ERBB2.

Tabuľka 59 PPC testu TSO Comprehensive (EU) na detekciu amplifikácií génov v rámci kombinovaných členov panela, na ktoré cieľila analýza

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Variant, na ktorý cieľila analýza	Stredná pozorovaná násobná zmena ²	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI ³
Približne 2 – 3× limit LOD	MET	5,14	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2 × LOD	ERBB2	2,33	100,0 % (47/47)	(92,4 %, 100,0 %)

¹ Úroveň variantu vypočítaná zo strednej hodnoty pozorovanej násobnej zmeny.

² Stredná hodnota násobnej zmeny vypočítaná z pozorovaných výsledkov analýzy.

³ Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou Wilsonovej metódy skóre.

100 % hodnôt PNC bolo v rámci amplifikácií génov.

Tabuľka 60 uvádza analýzu komponentov variancie pre výsledky násobnej zmeny pre každý zdroj odchýlky a celkovú odchýlku u všetkých členoch panela s amplifikáciami génov, na ktoré cieľila analýza.

Tabuľka 60 Analýza komponentov variancie násobnej zmeny cielených amplifikácií génov

Variant, na ktorý cieľila analýza	N	Stredná hodnota násobnej zmeny	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokality) (% CV)	SD dňa (lokality, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabuľka 61 uvádza PPC pre cielené členy panela MSI-H. Hodnoty PPC boli 100 % pre obidva členy panela MSI-H.

Tabuľka 61 PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) pri detekcii stavu MSI-H v kombinovaných cieľných členoch panela

Člen panela	Stredná hodnota skóre MSI ¹	N	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval 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 %)
Všetky členy		68	100,0 % (68/68)	(94,7 %, 100,0 %)

¹ Stredné pozorované skóre MSI vypočítané z pozorovaných výsledkov analýzy.

² Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Tabuľka 62 uvádza analýzu komponentov variancie pre výsledky skóre MSI pre každý zdroj odchýlky a celkovú odchýlku u všetkých členov panela, pre ktorých sa zisťoval stav MSI-H.

Tabuľka 62 Analýza komponentov variancie skóre MSI pre členy panela, pre ktoré sa zisťoval stav MSI-H

Člen panela	N	Stredná hodnota skóre MSI	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokality) (% CV)	SD dňa (lokality, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

Na hodnotenie reprodukovateľnosti skóre TMB sa uskutočnila kvantitatívna analýza skóre v paneli členov TMB, na ktorých cieľila analýza, ktorý predstavoval rozsah očakávaných skóre TMB. Tabuľka 63 uvádza analýzu komponentov variancie pre výsledky skóre TMB pre každý zdroj odchýlky a celkovú odchýlku u členov panela TMB. Celkové hodnoty SD skóre TMB dosahovali 1,0 (% CV = 13) pre jeden člen panela (stredné skóre TMB = 7,6) a 1,1 (% CV = 2) pre druhý člen panela (stredné skóre TMB = 63,2).

Tabuľka 63 Analýza komponentov variancie skóre TMB pre členy panela TMB, na ktoré cieľila analýza

Člen panela	N	Stredná hodnota skóre TMB	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokality) (% CV)	SD dňa (lokality, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

Existoval 1 člen panela TMB, v súvislosti s ktorým bol počet pozorovaní príliš malý (N = 2) na prispôbenie modelu komponentov variancie. Celková SD tohto člena panela bola 1,7.

Varianty RNA

Tabuľka 64 uvádza PPC pre ciele RNA. Hodnoty PPC dosiahli hodnotu od 91,7 % (KIF5B-RET) do 100 % vo väčšine variantov RNA.

Tabuľka 64 PPC analýzy TSO Comprehensive (EU) pri detekcii variantov RNA v kombinovaných členoch panela, na ktoré cieľila analýza

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Typ variantu	Variant, na ktorý cieľila analýza	Stredná hodnota podporných čítaní ²	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI ³
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	ACPP-ETV1	44,7	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	EML4-ALK	49,3	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	FGFR1-GSR	61,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2 × LOD	Fúzia	KIF5B-RET	11,6	91,7 % (44/48)	(80,4 %, 96,7 %)
<2 × LOD	Fúzia	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

Pozorovaná úroveň variantu ¹	Typ variantu	Variant, na ktorý cieľila analýza	Stredná hodnota podporných čítaní ²	Percento pozitívnych stanovení (%)	95 % interval CI ³
<2 × LOD	Fúzia	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
<2 × LOD	Fúzia	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Fúzia	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 % (47/48)	(89,1 %, 99,6 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Variant zozrihu	EGFR vIII	64,0	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
Približne 2 – 3× limit LOD	Variant zozrihu	Vynechanie MET exónu 14	61,2	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

¹ Úroveň variantu vypočítaná so strednej hodnoty pozorovaných podporných čítaní.

² Stredná hodnota podporných čítaní vypočítaná z pozorovaných výsledkov analýzy.

³ Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou Wilsonovej metódy skóre.

Hodnota PNC dosiahla 100 % pre každý variant RNA, na ktorý cieľila analýza, okrem fúzie FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60 % (984/988; 95 % interval CI: 98,96 % až 99,84 %).

Tabuľka 65 uvádza analýzu komponentov variácie výsledkov podporných čítaní pre každý zdroj variácie a celkovú variáciu vo všetkých členoch panela s variantmi RNA, na ktoré cieľila analýza.

Tabuľka 65 Analýza komponentov variácie podporných čítaní pre varianty RNA, na ktoré cieľila analýza

Variant, na ktorý cieľila analýza	N	Stredná hodnota podporných čítaní	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokality) (% CV)	SD dňa (lokality, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)

Variant, na ktorý cieľila analýza	N	Stredná hodnota podporných čítaní	SD lokality (% CV)	SD operátora (lokalita) (% CV)	SD dňa (lokalita, operátor) (% CV)	SD šarže (% CV)	SD chodu (% CV)	Celková SD (% CV)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR vIII, variant zstrihu	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Variant zstrihu s vynechaním MET exónu 14	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Presnosť v rámci laboratória

Uskutočnili sa dve štúdie zamerané na hodnotenie presnosti analýzy TSO Comprehensive (EU) v rámci laboratória. Štúdia 1 hodnotila fúzie NTRK a RET, ako aj malé varianty DNA RET. Štúdia 2 hodnotila TMB a MSI.

Štúdia 1

Uskutočnilo sa hodnotenie presnosti detegovania NTRK1 v rámci laboratória – 3 fúzie (glióm nižšej triedy, multiformný glioblastóm, myofibroblastický sarkóm, rakovina vylučovacích žliaz), fúzie RET (rakovina štítnej žľazy a kožného tkaniva s neznámym typom rakoviny) a malé varianty RET DNA (medulárna rakovina štítnej žľazy) použitím tkanív FFPE z indikovaných typov rakoviny. Každá vzorka bola testovaná na dvoch úrovniach variantu: približne 1× limit LoD (nízka úroveň variantu) a približne 2 – 3× limit LoD (vysoká úroveň variantu) s výnimkou vzorky nachádzajúcej sa v CCDC6-RET, ktorá bola testovaná iba na nízkej úrovni variantu. Každá zo vzoriek na každej úrovni testu bola spracovaná duplicitne v rámci každej prípravy knižnice troma (3) operátormi. Každý operátor začal s prípravou knižnice v priebehu troch (3) po sebe nenasledujúcich dní začiatku so sekvenovaním v troch (3) vyhradených prístrojoch NextSeq 550Dx. Boli testované tri (3) šarže reagencií, t. j. na jednu úroveň bolo generovaných 54 pozorovaní. Niektoré úrovne vykazovali menej než 54 pozorovaní v dôsledku neplatných knižníc.

Kvalitatívna analýza

Kvalitatívna konkordancia stanovenia variantu bola hodnotená osobitne pre dve úrovne daného variantu zo združených pozorovaní v rámci všetkých premenných (operátori, šarže reagencií, prístroje, dni a replikáty). Súhrnné informácie o percente pozitívnych stanovení (PPC) a percente negatívnych stanovení (PNC), ako aj o súvisiacom obojstrannom 95 % intervale spoľahlivosti (Wilsonovo skóre) uvádza [Tabuľka 66](#) (malé varianty DNA) a [Tabuľka 67](#) (fúzie RNA).

Na vysokej úrovni variantu (približne 2 – 3-násobok limitu LoD) preukázala analýza TSO Comprehensive (EU) 100 % PPC a PNC v rámci všetkých testovaných variantov.

Na nízkej úrovni variantu (približne 1-násobok limitu LoD) bol rozsah PPC v prípade malých variantov DNA 83,3 % až 98,1 % a rozsah PPC v prípade fúzií RNA 90,7 % až 100 %. V prípade variantov s hodnotou PPC < 95 % sa stredné hodnoty VAF (RET C634Y a RET D898_E901del) alebo podporných čítaní (NCOA4-RET a BCAN-NTRK1) nachádzali pod príslušnými detekčnými limitmi. Na nízkej úrovni variantu sa u všetkých variantov dosiahla hodnota 100 % PNC.

Tabuľka 66 Kvalitatívne výsledky variantov DNA, na ktoré cielila analýza

Úroveň variantu	Variant	Typ variantu	Stredná hodnota VAF	PPC (95 % interval spoľahlivosti CI)	PNC (95 % interval spoľahlivosti CI)
Nízka (približne 1-násobok 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	DELÉCIA	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*	DELÉCIA	0,056	98,1 % (53/54) (90,2 % – 99,7 %)	100,0 % (215/215) (98,2 % – 100,0 %)
Vysoká (približne 3-násobok 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	DELÉCIA	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*	DELÉCIA	0,161	100,0 % (32/32) (89,3 % – 100,0 %)	100,0 % (214/214) (98,2 % – 100,0 %)

* Zmeny nukleotidov sú uvedené pre každý variant v časti Detekčný limit (okrem RET D631_L633delinsE, t. j. chromozóm 10, pozícia 43609940, referencia ACGAGCT, alternatíva A).

Tabuľka 67 Kvalitatívne výsledky fúzií RNA, na ktoré cieľila analýza

Úroveň variantu	Fúzia	Stredná hodnota podporných čítaní	PPC (95 % interval spoľahlivosti CI)	PNC (95 % interval spoľahlivosti CI)
Nízka	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 (bunková línia FFPE)	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 %)
	Vysoká	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 % (54/54) (93,4 %, 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 (Bunková línia FFPE)		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		Nevzťahuje sa	Netestované	100,0 % (589/589) (99,4 %, 100,0 %)

Kvantitatívna analýza

Uskutočnila sa analýza komponentov variancie s obmedzeným odhadom maximálnej pravdepodobnosti (vierohodnosť, REML), ktorej cieľom bolo hodnotenie celkovej variácie základných kontinuálnych premenných (VAF v prípade malých variantov DNA a podporné čítania v prípade fúzií RNA) a odhadnutie komponentov presnosti [štandardná odchýlka (SD), koeficient variácie (CV)] pre každý zdroj variácií [operátori, prístroje, dni, šarže reagensí, reziduá a celkom]. Výsledky uvádza [Tabuľka 68](#) (malé varianty DNA) a [Tabuľka 69](#) (fúzie RNA).

Variácia VAF rástla spolu so strednou hodnotou podľa očakávania pre binomiálnu distribúciu. Variácia v oblasti podporných čítaní rástla spolu so strednou hodnotou podľa predpokladu platného pre počty. Reziduálny komponent mal najvyšší podiel na celkovej variancii malých variantov DNA aj fúzií RNA na obidvoch úrovniach, čo podporuje záver, že detekcia týchto variantov analýzou TSO Comprehensive (EU) je z hľadiska operátorov, šarží, prístrojov a dní robustná.

Tabuľka 68 Kvantitatívne výsledky SD a CV pre ciele malé varianty DNA

Úroveň VAF	Variant	Typ variantu	N platných pokusov	Stredná hodnota VAF	Operátor SD (% CV)	Prístroj SD (% CV)	SD šarže (% CV)	Denná hodnota SD (% CV)	Reziduum SD (% CV)	Celkom SD (% CV)
Nízka (približne 1-násobok LoD)	RET D898_E901del	DELÉCIA	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	DELÉCIA	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)

Úroveň VAF	Variant	Typ variantu	N platných pokusov	Stredná hodnota VAF	Operátor SD (% CV)	Prístroj SD (% CV)	SD šarže (% CV)	Denná hodnota SD (% CV)	Reziduuum SD (% CV)	Celkom SD (% CV)
Vysoká (približne 3-násobok LoD)	RET D898_E901del	DELÉCIA	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	DELÉCIA	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)

Tabuľka 69 Kvantitatívne výsledky SD a CV fúzií RNA, na ktoré cieľila analýza

Úroveň podporných čítaní	Fúzia	N platných pokusov	Stredná hodnota podporných čítaní	SD operátora (% CV)	SD prístroja (% CV)	SD šarže (% CV)	SD dňa (% CV)	Reziduálna SD (% CV)	Celková SD (% CV)
Nízka	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 (bunková línia)	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)

Úroveň podporných čítaní	Fúzia	N platných pokusov	Stredná hodnota podporných čítaní	SD operátora (% CV)	SD prístroja (% CV)	SD šarže (% CV)	SD dňa (% CV)	Reziduálna SD (% CV)	Celková SD (% CV)
Vysoká	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 (bunková línia)	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)

Štúdia 2

Uskutočnilo sa hodnotenie TMB a MSI z hľadiska presnosti v rámci laboratória. Na hodnotenie presnosti na rôznych úrovniach v rámci rozsahov skóre bolo použitých päť vzoriek NSCLC FFPE DNA (TMB) a sedem vzoriek CRC FFPE (MSI) vrátane mikrosatelitne stabilnej (MSS) vzorky a vzorky s vysokou úrovňou MSI. Každá zo vzoriek bola spracovaná duplicitne troma (3) operátormi, počas troch (3) dní použitím troch (3) príprav knižnice pre tri (3) šarže reagentov pomocou troch prístrojov NextSeq 550Dx, výsledkom čoho bolo 54 pozorovaní na jednu úroveň.

Kvalitatívna konkordancia bola hodnotená pre stav MSI. Analýza TSO Comprehensive (EU) preukázala 100 % konkordanciu z hľadiska percenta pozitívnych stanovení a percenta negatívnych stanovení stavu MSI. V prípade TMB vykazuje analýza TSO Comprehensive (EU) skóre TMB; kvalitatívnu konkordanciu nemožno uplatniť.

Celková variácia skóre TMB a MSI spolu s podielom podľa zdroja (prístroje, operátori, šarže, dni a rezíduum) bola kvantifikovaná použitím modelu komponentov variácie v rámci rozsahu skóre. Štandardnú odchýlku (SD) a koeficient variácie (CV) uvádza [Tabuľka 70](#) (TMB) a [Tabuľka 71](#) (MSI) podľa úrovne. Niektoré úrovne vykazovali menej než 54 pozorovaní v dôsledku neplatných knižníc.

Tabuľka 70 Kvalitatívne výsledky SD a CV skóre TMB

Úroveň	Stredná hodnota skóre TMB	N platných pokusov	Operátor SD (% CV)	Prístroj SD (% CV)	Šarža SD (% CV)	Deň SD (% CV)	Rezíduum SD (% CV)	Celkom SD (% CV)
L1	0,3	52	0,00 (0 %)	0,06 (23 %)	0,00 (0 %)	0,08 (30 %)	0,40 (146 %)	0,41 (151 %)
L2	8,4	53	0,00 (0 %)	0,14 (2 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	0,71 (8 %)	0,73 (9 %)
L3	15,1	54	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	0,20 (1 %)	0,00 (0 %)	1,16 (8 %)	1,18 (8 %)
L4	20,3	53	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	0,06 (0 %)	0,00 (0 %)	0,56 (3 %)	0,57 (3 %)
L5	42,3	54	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	0,15 (0 %)	0,00 (0 %)	1,37 (3 %)	1,38 (3 %)

Tabuľka 71 Kvalitatívne výsledky SD a CV skóre MSI

Stav MSI	Úroveň	Stredná hodnota skóre MSI (%)	N platných pokusov	Operátor SD (% CV)	Prístroj SD (% CV)	Šarža SD (% CV)	Deň SD (% CV)	Rezíduum SD (% CV)	Celkom SD (% CV)
MS-stabilné	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 %)

Stav MSI	Úroveň	Stredná hodnota skóre MSI (%)	N platných pokusov	Operátor SD (% CV)	Prístroj SD (% CV)	Šarža SD (% CV)	Deň SD (% CV)	Reziduum SD (% CV)	Celkom SD (% CV)
MS- vysoké	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 %)

Variácia skóre TMB má tendenciu rásť spolu so strednou hodnotou podľa predpokladu odvodeného z teoretických distribúcií údajov počtu. Variácie v prípade skóre MSI pre úrovne blížiacie sa skóre MSI = 50 sú väčšie než variácie skóre MSI blížiacich sa 0 alebo sú 100 % konzistentné s variabilitou získanou z teoretických distribúcií proporčných údajov. Reziduálny komponent ostal prvkom s najvyšším podielom na celkovej variancii skóre MSI aj TMB, čo podporuje záver, že skóre sú z hľadiska operátorov, šarží, prístrojov a dní robustné.

Hodnoty C5 a C95 blížiacie sa hraničnej hodnote 20,00 % boli stanovené pre MSI pomocou profilu presnosti (Tabuľka 72).

Tabuľka 72 Intervaly C5 – C95 pre MSI

Skóre	C5	C95
MSI	17,17 %	23,32 %

Keďže však MSI a TMB sú komplexné biomarkery, analytická účinnosť sa medzi jednotlivými vzorkami môže odlišovať. To znamená, že variácia TMB nezávisí iba od hodnoty TMB, ale aj od zloženia variantov vo vzorke, ako napríklad typ variantu (SNV, indel) a úrovne VAF (vzdialenosť od hraničnej hodnoty zahrnutia). Podobne ani variácia MSI nezávisí iba od hodnoty MSI, ale aj od zloženia lokalít vo vzorke, ako napríklad počtu nestabilných lokalít a rozsahu nestability danej lokality.

Uskutočnilo sa hodnotenie vplyvu obsahu tumoru na skóre TMB a MSI. V rámci väčšiny vzoriek mal tumor s obsahom ≥ 30 % zanedbateľný vplyv na skóre TMB približne nad 10 mutácií na megabázu. S rastúcim obsahom tumoru ostali skóre TMB relatívne nezmenené. V prípade vzoriek s vysokou hodnotou MSI vykazoval obsah tumoru pozitívnu lineárnu koreláciu so skóre MSI. Vzorky s vysokou hodnotou MSI ostali v priemere vzorkami v stave MSI-H v prípade obsahu tumoru ≥ 30 %. Vzorky endometria sa správali výrazne odlišne než iné druhy tkaniva a vyžadovali vyšší podiel tumoru na to, aby boli stanovené ako MSI-H.

Správnosť pre profilovanie tumoru

Detekcia variantov analýzou TSO Comprehensive (EU) bola porovnaná s výsledkami referenčných metód. Malé varianty DNA a TMB boli porovnané s externou validovanou metódou sekvenovania celého genómu ngS. Amplifikácie génov boli porovnané s tou istou metódou ngS sekvenovania celého exómu alebo boli validované pomocou metódy duálnej hybridizácie in-situ (DISH) v prípade amplifikácií HER2. Produkt MSI bol hodnotený pomocou validovaného testu MSI-PCR. Varianty zotrihu RNA boli porovnané so schválenou kvantitatívnou metódou PCR (qPCR). Fúzie ROS1 a ALK boli porovnané s validovanými analýzami FISH. Všetky ostatné fúzie boli porovnané s kompozitnou metódou skladajúcou sa z validovanej analýzy celého exómu ngS (RNGS1), panela ngS, na ktorý cieľila analýza (RNGS2) a kvapôčkovej digitálnej PCR (ddPCR).

Detekcia malých variantov DNA

Detekcia malých variantov DNA podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) bola porovnaná s výsledkami sekvenovania celého exómu (WES), ktoré využíva metódu WES spolu so vzorkami tumorov priradenými k vzorkám normálneho tkaniva toho istého jedinca na stanovenie malých zárodočných a somatických variantov. Porovnanie malých variantov pozostávajúcich z jednonukleotidových variantov (SNV), inzercí a delécií bolo založené na 124 vzorkách zo 14 odlišných typov tkaniva, ktoré boli platné pre analýzu TSO Comprehensive (EU) a WES. Analýza TSO Comprehensive (EU) na rozdiel od analýzy WES dokáže detegovať multinukleotidové varianty (MNV, 2 – 3 bp), ktoré vyžadujú fázovanie. MNV boli analýzou TSO Comprehensive (EU) hodnotené ako jednotlivé SNV v porovnaní s analýzou WES. Súhrnné informácie o konkordancii na úrovni variantu vrátane percenta pozitívnej zhody (PPA) a percenta negatívnej zhody (NPA) pre všetky stanovenia variantov uvádza [Tabuľka 73](#).

Tabuľka 73 Súhrnné informácie o konkordancii pre stanovenie malých variantov hodnotených podľa stavu zárodočných alebo somatických buniek

	Sekvenovanie WES somatických buniek – analyzované	Sekvenovanie WES zárodočných buniek – analyzované	WES – žiadne analýzy
Stanovené analýzou TSO Comprehensive (EU)	382	33 163	426
Nestanovené analýzou TSO Comprehensive (EU)	69	61	70 000 481
Celkom	451	33 224	70 000 907

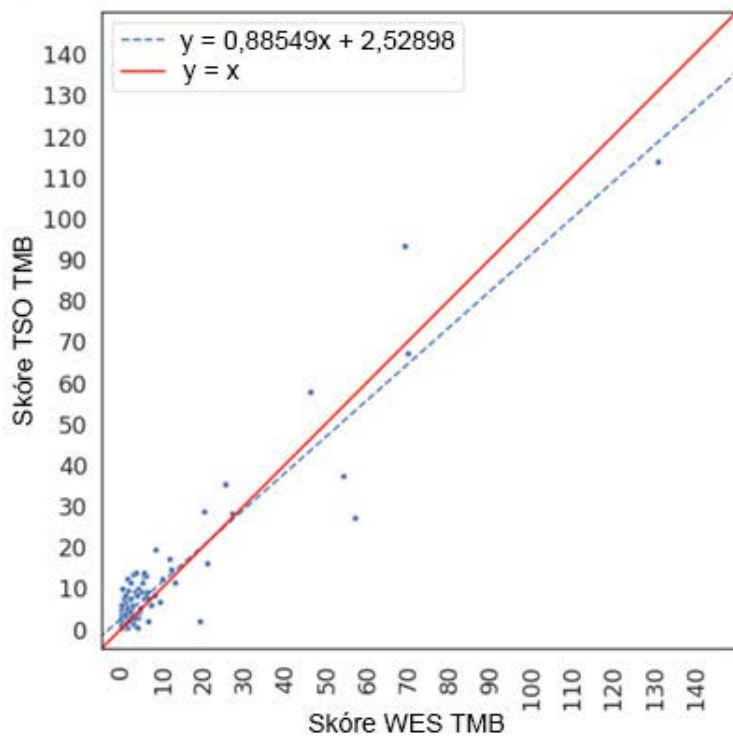
	Sekvenovanie WES somatických buniek – analyzované	Sekvenovanie WES zárodočných buniek – analyzované	WES – žiadne analýzy
Percentuálna zhoda	PPA: 85 % (382/451), 95 % interval CI: [81 % – 87 %]	PPA: > 99 % (33 163/33 224) 95 % interval CI: [99,8 % – 99,9 %]	NPA: > 99 % (70 000 481/70 000 907) 95 % interval CI: [99,999 % – 99,999 %]

Analýzou TSO Comprehensive (EU) bolo celkom stanovených 426 somatických variantov, ktoré neboli metódou WES detegované. Dvestoštyri (48 %) spomedzi týchto variantov vykazovalo frekvencie variantnej alely pod prahovou hodnotou stanovenia metódou WES. Spomedzi zostávajúcich potenciálnych falošne pozitívnych variantov existoval dôkaz o stanovení variantu metódou WES s nízkou mierou podpory. Okrem toho mnohé varianty vykazovali veľmi nízku úroveň evidencie pri použití metódy WES v priradených vzorkách normálneho tkaniva. To naznačuje, že tieto varianty boli pri analýze WES vynechané z dôvodu kontaminácie normálneho tkaniva bunkami tumoru.

Detekcia mutačnej záťaže tumoru (TMB)

Konkordancia TMB bola určená porovnaním skóre TMB (somatické mutácie/megabáza) získaného metódou WES a analýzou TSO Comprehensive (EU) na 124 vzorkách s dostupnými údajmi z analýz TSO Comprehensive (EU) a WES. Lineárna regresná analýza s metódou WES ako prediktorom vykazovala hodnotu y-zachytenia 2,53, strmosť 0,89 a Pearsonov koeficient korelácie 0,94 ([Obrázok 3](#)).

Obrázok 3 Korelácia skóre TMB – analýzy WES a TSO Comprehensive (EU)



Detekcia amplifikácie génu

Detekcia amplifikácií génov pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) bola porovnaná s výsledkami rovnakej analýzy WES s využitím buď vzoriek tumorov priradených k vzorkám normálneho tkaniva toho istého jedinca, alebo vzoriek odobratých iba tumoru. Celkom išlo o 420 vzoriek, spomedzi ktorých sa pri 183 použila metóda ortogonálneho odberu z tumoru/normálneho (zdravého) tkaniva a 237 použilo metódu, pri ktorých sa vzorky odobrali iba z tumoru. Vzorky pochádzali zo 14 typov tkaniva a obsahovali amplifikácie z 55 génov. Analýza TSO Comprehensive (EU) vykazuje amplifikácie génu z génov MET a ERBB2. Správnosť však bola hodnotená pre všetkých 55 génov. Súhrn stanovení amplifikácie génu uvádza [Tabuľka 74](#).

Tabuľka 74 Stanovenia amplifikácie génu

	Pozitívne podľa analýzy WES	Negatívne podľa analýzy WES
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	337	415
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	28	24 000
Celkom	365	24 415

	Pozitívne podľa analýzy WES	Negatívne podľa analýzy WES
Percentuálna zhoda	PPA: 92 % (337/365) 95 % interval CI: [89 %, 95 %]	NPA: 98,3 % (24 000/24 415) 95 % interval CI: [98,1 %, 98,5 %]

Amplifikácie ERBB2 (HER2) v tkanivách žalúdka a prsníka boli analyzované osobitne od iných génových amplifikácií použitím metódy duálnej hybridizácie in-situ (DISH). Celkom bolo testovaných 116 vzoriek prsného a žalúdočného tkaniva, spomedzi ktorých bolo 64 predtým charakterizovaných ako pozitívnych na HER2 podľa metódy IHC alebo FISH. Extrakcia jednej vzorky zlyhala, 3 vzorky vykazovali neúspešnú platnosť podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a 3 vzorky vykazovali neúspešnú platnosť podľa analýzy DISH. Spomedzi 108 vzoriek získalo 20 (18,5 %) hraničné skóre (od 1,5 do 2,5) v blízkosti hraničnej hodnoty DISH 2,0. Výsledky konkordancie vrátane PPA, NPA pre všetky vzorky, ako aj s vylúčením hraničných prípadov HER2 DISH, uvádza [Tabuľka 75](#).

Tabuľka 75 Súhrnné informácie o konkordancii medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a HER2 DISH vrátane amplifikácie génu HER2

Amplifikácia génu HER2 (tkanivá prsníka a žalúdka)	HER2 DISH s amplifikáciou	HER2 DISH bez amplifikácie
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	17 (vrátane 1 hraničného prípadu)	13 (vrátane 1 hraničného prípadu)
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	10 (vrátane 6 hraničných prípadov)	68 (vrátane 12 hraničných prípadov)
Percentuálna zhoda vrátane hraničných prípadov	PPA: 63 % (17/27) 95 % interval CI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 % interval CI: [74 %, 90 %]
Percentuálna zhoda bez hraničných prípadov	PPA: 80 % (16/20) 95 % interval CI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 % interval CI: [72 %, 90 %]

Detekcia mikrosatelitnej nestability

Detekcia mikrosatelitnej nestability podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) bola porovnaná s výsledkami validovaného testu MSI-PCR, ktorý využíva na testovanie vzorky tumorov priradené k vzorkám normálneho tkaniva toho istého jedinca. Porovnaných bolo celkom 195 vzoriek spĺňajúcich požiadavku na obsah tumoru $\geq 30\%$ a predstavujúcich 14 typov tkaniva. Test MSI-PCR hodnotí 5 lokalít a poskytuje 3 výstupy – MSS (bez nestabilných oblastí), MSI-Low (jedna nestabilná oblasť) a MSI-High (najmenej dve nestabilné oblasti). Analýza TSO Comprehensive (EU) hodnotí až 130 mikrosatelitných oblastí a klasifikuje vzorky iba ako MSS alebo MSI-High ($\geq 20\%$ nestabilných oblastí). V prípade MSI-PCR boli výsledky MSI-Low zoskupené s výsledkami MSS. Analýzu konkordancie uvádza [Tabuľka 76](#).

Tabuľka 76 Súhrn analýzy konkordancie medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a testom MSI-PCR – mikrosatelitná nestabilita DNA

Nestabilita MSI	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSS
Nestabilné podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (MSI-High)	40	2	0
Stabilné podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (MSS)	3	0	150
Celkom	43	2	150
Percentuálna zhoda	PPA: 93 % (40/43) 95 % interval CI: [81 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 % interval CI: [95 %, > 99 %]	

Detekcia variantov zostrihu RNA

Presnosť detekcie variantu zostrihu bola počítaná porovnaním výsledkov testu TSO Comprehensive (EU) s analýzami qPCR zameranými na EGFRvIII a Met Exon 14del vrátane jednej známej pozitívnej RNA pre každý z variantov zostrihu. Analýza konkordancie bola vykonaná s celkovým počtom 230 jedinečných vzoriek FFPE RNA zo 14 typov tkanív s dostupnými údajmi podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a referenčnej metódy. Všetky vzorky boli testované na prítomnosť MET exónu 14del a EGFRvIII boli testované iba v mozgovom tkanive. Tri vzorky boli stanovené ako pozitívne na MET exón 14del podľa qPCR, nie však podľa analýzy TSO Comprehensive (EU), a vykazovali priemernú hodnotu Ct > 37 a boli pod úrovňou limitu LoD analýzy TSO Comprehensive (EU). Tabuľka 77 uvádza súhrn výsledkov štúdie konkordancie.

Tabuľka 77 Súhrn analýzy konkordancie medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a analýzou qPCR – varianty zostrihu RNA

Varianty zostrihu RNA	Pozitívne podľa qPCR	Negatívne podľa qPCR
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	3	0
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (EGFRvIII)	0	13
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (Met Exon 14Del)	1	0
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) (Met Exon 14Del)	3	217

Varianty zozrihu RNA	Pozitívne podľa qPCR	Negatívne podľa qPCR
Celkom	7	230
Percentuálna zhoda	PPA: 57 % (4/7) 95 % interval CI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 % interval CI: [98 %, 100 %]

Detekcia fúzie RNA

Porovnanie s kompozitnou metódou

Fúzie TSO Comprehensive (EU) boli porovnané s kompozitnou metódou pozostávajúcou zo sekvenovania celého exómu RNA použitím panela na sekvenovanie ngS(RNGS1), panela fúzií na cielečné sekvenovanie ngS(RNGS2) a kvapôčkovej digitálnej PCR (ddPCR, droplet digital PCR).

Metóda RNGS1 sa prekrýva so všetkými génmi, pri ktorých dokáže analýza TSO Comprehensive (EU) detegovať fúzie. Detekčný limit metódy RNGS1 však predstavoval 4 až 8-násobok detekčného limitu TSO Comprehensive (EU) na základe počtu podporných čítaní pozorovaných v analýzach prekrývajúcich sa fúzií. Znamená to, že s metódou WES (RNGS1) bola použitá kompozitná metóda spolu s dvoma ďalšími metódami s vyššou citlivosťou, ale menším rozsahom pre fúzie.

Pomocou metódy RNGS1 bolo testovaných celkom 255 jedinečných vzoriek RNA predstavujúcich 14 typov tkaniva, ktoré úspešne splnili metriky testu TSO Comprehensive (EU). V rámci kontroly kvality metódy RNGS1 boli dve vzorky neplatné a z ďalšej analýzy boli vylúčené. Spomedzi 82 fúzií stanovených analýzou TSO Comprehensive (EU) boli 4 vylúčené z hodnotenia v dôsledku zlyhání počas kontroly kvality režimu RNGS1 a 7 ďalších fúzií nebolo možné stanoviť v dôsledku neexistencie cieľov v paneli RNGS1. Spomedzi zvyšných 71 fúzií stanovených analýzou TSO Comprehensive (EU) bolo 9 fúzií potvrdených metódou RNGS1. Metóda RNGS1 stanovila 4 fúzie, ktoré analýza TSO Comprehensive (EU) nestanovila.

Spomedzi 62 fúzií, ktoré boli podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) pozitívne a neboli detegované metódou RNGS1, bolo 13 prekrývajúcich sa a potvrdených metódou RNGS2. Metóda RNGS2 stanovila jednu fúziu, ktorú však analýza TSO Comprehensive (EU) nestanovila.

Kvapôčková digitálna PCR bola následne použitá pre fúzie stanovené analýzou TSO Comprehensive (EU), nestanovené alebo nestanoviteľné metódou RNGS1 a nehodnotiteľné metódou RNGS2 (49). Okrem toho sa ddPCR použilo na opakované hodnotenie 2 zo 4 falošne negatívnych fúzií podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy RNGS1, a 2 z 9 konkordantných fúzií podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy RNGS1. Na zaistenie špecificity bolo zahrnutých päť vzoriek negatívnych z hľadiska stanovenia fúzií do testovania každej pozitívnej vzorky fúzie. Osemnásť fúzií nebolo testovaných pomocou metódy ddPCR v dôsledku nemožnosti vytvoriť návrh primérov/sond, viacnásobných génových partnerov fúzie alebo nedostatku zvyšného materiálu FFPE. V prípade ddPCR boli priméry a sondy vytvorené vzhľadom na pozorované body zlomu v teste TSO Comprehensive (EU).

Celkom bolo detegovaných 52 fúzií pomocou metódy ddPCR, z ktorých 41 bolo stanovených analýzou TSO Comprehensive (EU), ale nebolo stanovených alebo nebolo stanoviteľných metódou RNGS1. Deväť fúzií bolo stanovených metódou ddPCR, ktoré však boli negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) alebo metódy

RNGS1. Dve fúzie pozitívne podľa ddPCR potvrdili 2 konkordantné fúzie podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy RNGS1. Žiadna fúzia nebola detegovaná metódou ddPCR v prípade 2 opakovane hodnotených falošne negatívnych vzoriek podľa TSO Comprehensive (EU) a metódy RNGS1; na základe porovnania s RNGS1 však tieto vzorky boli započítané ako falošne negatívne.

Metódy získania kompozitných konkordantných výsledkov RNGS1, RNGS2 a ddPCR pre fúzie uvádza [Tabuľka 78](#).

63 fúzií konkordantných s kompozitnou metódou predstavovalo 43 génov na paneli TSO Comprehensive (EU). Fúzie sú však spôsobilé na vykazovanie iba pre 23 génov, ktoré indikuje [Analytický panel génov TSO Comprehensive \(EU\)](#) na strane 2.

Tabuľka 78 Krížová tabuľka výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) v porovnaní s kompozitnou metódou – fúzie RNA (253 vzoriek)

Fúzie	Pozitívne podľa kompozitnej metódy	Negatívne podľa kompozitnej metódy
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	63 ¹	18
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	14 ²	13 821
Celkom	77	13 839
Percentuálna zhoda	PPA: 82 % (63/77) 95 % interval CI: [72 %, 89 %]	NPA: 99,9 % (13821/13839) 95 % interval CI: [99,8 %, 99,9 %]

¹ 63 skutočne pozitívnych vzoriek podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) = 9 pozitívnych a konkordantných s RNGS1 + 13 pozitívnych a konkordantných s RNGS2 + 41 pozitívnych a konkordantných s ddPCR.

² 14 falošne negatívnych vzoriek podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) = 4 negatívne a nekonkordantné s RNGS1 + 1 negatívna a nekonkordantná s RNGS2 + 9 negatívnych a nekonkordantných s ddPCR.

Porovnanie s metódou FISH – fúzie ROS1 a ALK

Dvadsaťpäť vzoriek NSCLC bolo testovaných metódou FISH z hľadiska fúzií ROS1 a ALK, a 5 ďalších vzoriek NSCLC bolo testovaných z hľadiska fúzie ROS1. Osem vzoriek v dôsledku nevhodného/nedostatočného tkaniva v rámci metódy FISH (pre ROS1) zlyhalo. Dve fúzie ROS1 a jedna fúzia ALK boli detegované analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódou FISH. Neboli pozorované žiadne diskordantné výsledky. [Tabuľka 79](#) obsahuje súhrn výsledkov konkordancie analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy FISH pre fúzie ROS1 a ALK.

Tabuľka 79 Súhrn výsledkov konkordancie analýzy TSO Comprehensive (EU) a metódy FISH pre fúzie ROS1 a ALK

ALK + ROS1	Pozitívne podľa metódy FISH	Negatívne podľa metódy FISH
Pozitívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	3	0
Negatívne podľa analýzy TSO Comprehensive (EU)	0	44
Celkom	3	44
Percentuálna zhoda	PPA: 100 % (3/3) 95 % interval CI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 % interval CI: [92 %, 100 %]

Platnosť vzorky

Platnosť vzoriek (prvý pokus) bola odmeraná pre 181 jedinečných vzoriek RNA a 272 jedinečných vzoriek DNA z blokov FFPE ≤ 5 rokov. Tieto vzorky boli vybrané na základe typu tkaniva a dostupného materiálu; platnosť analýzy bola neznáma. Metrika kontroly kvality knižnice musí byť úspešná pre typ variantu, aby bol považovaný za platný. Platnosť vzoriek bola hodnotená osobitne pre každý z typov variantov (malé varianty DNA/TMB, MSI, amplifikácie génov, fúzie/varianty zostrihu) a uvádza ich [Tabuľka 80](#).

Tabuľka 80 Platnosť vzorky

Typ variantu	Platnosť vzorky
Fúzie/varianty zostrihu (RNA)	76 %
Malé varianty DNA/TMB	75 %
MSI	72 %
Amplifikácia génu	94 %

Súhrn analytickej validácie predpokladov profilovania tumoru

Na základe údajov o detekčnom limite, presnosti, reprodukovateľnosti a správnosti bola analýza TSO Comprehensive (EU) analyticky validovaná z hľadiska nasledujúcich faktorov:

- Malé varianty DNA – SNV, MNV, inzercie a delécie
- TMB
- MSI
- Amplifikácie génov MET a ERBB2 (HER2) (Pozri [Analytický panel génov TSO Comprehensive \(EU\) na strane 2](#)).
- 23 génov, pre ktoré je možné detegovať fúzie (Pozri [Analytický panel génov TSO Comprehensive \(EU\) na strane 2](#)).

- Varianty zostrihu EGFR a MET (Pozri [Analytický panel génov TSO Comprehensive \(EU\)](#) na strane 2).

Klinická účinnosť NTRK

Na validáciu analýzy TSO Comprehensive (EU) ako pomocného diagnostického nástroja (CDx) na výber pacientov na liečbu produktom VITRAKVI® (larotrectinib) boli testované vzorky od pacientov zaregistrovaných do klinických skúšaní larotrectinibu (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; spolu ako klinické skúšania larotrectinibu), hraničným termínom získavania údajov bol 15. júl 2019, doplnené komerčne získanými tkanivovými vzorkami FFPE, s cieľom doplniť štúdiu presnosti analýzy TSO Comprehensive (EU) a doplnkovú klinickú štúdiu.

NCT02122913 bola multicentrická otvorená štúdia fázy 1 s eskaláciou dávky u dospelých pacientov s pokročilými tuhými tumormi (všetci) nevybratými pre rakovinu s pozitívnym nálezom fúzie NTRK. Po dokončení časti štúdie s eskaláciou dávky bolo iniciované rozšírenie dávky u pacientov so zdokumentovanou rakovinou, u ktorých sa zistila fúzia NTRK, a u pacientov, u ktorých skúšajúci bol presvedčený, že by mohli profitovať z použitia vysoko selektívneho inhibítora TRK. NAVIGATE NCT02576431 je pokračujúca multicentrická otvorená štúdia fázy 2 typu „basket“ u pacientov vo veku 12 rokov a viac s pretrvávajúcimi pokročilými tuhými tumormi a zdokumentovanou fúziou NTRK hodnotenou externým laboratóriom. SCOUT NCT02637687 je pokračujúca multicentrická otvorená štúdia fázy 1/2 vykonávaná na detských pacientoch počnúc vekom narodenia po dosiahnutí 21 rokov s pokročilým tuhým tumorom alebo tumorom centrálnej nervovej sústavy (CNS).

Spomedzi pacientov pozitívnych na fúziu NTRK zahrnutých do štúdie analýzy TSO Comprehensive (EU) vytvorilo 164 rozšírenú skupinu primárnej účinnosti larotrectinibu (ePAS4).

Štúdia presnosti detekcie fúzie NTRK1, NTRK2, NTRK3

Presnosť detekcie analýzy TSO Comprehensive (EU) pri detegovaní fúzií NTRK (NTRK1, NTRK2 alebo NTRK3) u pacientov s tuhými tumormi bola preukázaná hodnotením výsledkov konkordancie fúzie NTRK pri analýze TSO Comprehensive (EU) a pri schválenej ortogonálnej metóde na základe sekvenovania novej generácie (NGS).

Uskutočnila sa retrospektívna neintervenčná štúdia. Vzorky z klinického skúšania larotrectinibu a ďalšie vzorky boli testované analýzou TSO Comprehensive (EU) na jednom externom pracovisku a ortogonálnou metódou v centrálnom laboratóriu. Presnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) pri stanovení fúzie NTRK bola odhadnutá podľa ortogonálnej metódy; boli počítané percento pozitívnej zhody (PPA), percento negatívnej zhody (NPA) a súvisiace obojstranné intervaly spoľahlivosti (95 % CI).

Testovaných bolo 516 vzoriek pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) alebo ortogonálnej metódy. Spomedzi týchto vzoriek bolo testovaných 499 vzoriek obidvoma metódami. Sedemnást' spomedzi 516 vzoriek nebolo testovaných žiadnou z uvedených analýz v dôsledku neúspešnej extrakcie, kvôli neznámemu dôvodu (platí pre ortogonálnu metódu) alebo odchýlke od protokolu. Spomedzi 499 vzoriek testovaných obidvoma metódami bolo 170 (34,1 %) vzoriek vzorkami z klinického skúšania larotrectinibu a 329 (65,9 %) bolo doplnkových vzoriek.

Prepojenie výsledkov 499 vzoriek uvádza [Tabuľka 81](#). Spomedzi 499 vzoriek vykazovalo 85 vzoriek neplatné výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU); spomedzi nich 85, 53 taktiež vykazovalo neplatné výsledky ortogonálnej metódy. Ďalších 7 vzoriek vykazovalo neplatné výsledky ortogonálnej metódy. To znamená, že 407 zo 499 vzoriek vykazovalo platné výsledky podľa obidvoch metód.

Tabuľka 81 Štúdia presnosti NTRK: Výsledky podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a podľa ortogónálnej metódy pri detekcii fúzií NTRK

Výsledok analýzy TSO Comprehensive (EU)	Výsledok podľa ortogónálnej metódy			
	Fúzia NTRK – pozitívne	Fúzia NTRK – negatívne	Neplatné	Celkom
Fúzia NTRK – pozitívne	114	16	1	131
Fúzia NTRK – negatívne	4	273	6	283
Neplatné*	4	28	53	85
Celkom	122	317	60	499

* Neplatné výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) pochádzali z úrovne vzorky a chodu.

Analýzy zhody so zahrnutím a vylúčením neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) uvádza [Tabuľka 82](#). Po vylúčení neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) dosiahla hodnota PPA 96,6 % (114/118; 95 % CI: 91,5 % – 99,1 %) a NPA dosiahla 94,5 % (273/289; 95 % CI: 91,2 % – 96,8 %).

Tabuľka 82 Štúdia presnosti NTRK: Hodnoty PPA a NPA analýzy TSO Comprehensive (EU) porovnané s výsledkami ortogónálnej metódy pri detekcii fúzií NTRK

Miera zhody	Bez neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU)		S neplatnými výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU)	
	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI*	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI*
PPA	96,6 % (114/118)	91,5 % – 99,1 %	93,4 % (114/122)	87,5 % – 97,1 %
NPA	94,5 % (273/289)	91,2 % – 96,8 %	86,1 % (273/317)	81,8 % – 89,7 %

* 95 % interval CI podľa (presnej) Clopper-Pearsonovej metódy.

Doplnková klinická štúdia – detekcia fúzií NTRK1, NTRK2, NTRK3

Klinická platnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) pri detekcii fúzií NTRK1, NTRK2 alebo NTRK3 u pacientov s tuhými tumormi, ktorí môžu využívať výhody liečby larotrectinibom, bola preukázaná v rámci doplnkovej klinickej štúdie. Štúdia sa uskutočnila s cieľom zhodnotiť klinickú účinnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) pri identifikácii pacientov s fúziou NTRK1, NTRK2 alebo NTRK3 vhodných na liečbu larotrectinibom, a na hodnotenie konkordancie medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a lokálnymi testovacími metódami (LT) (používanými na určovanie stavu fúzie NTRK počas klinických skúšaní larotrectinibu).

Metódy LT zahŕňali ngS, fluorescenčnú hybridizáciu in situ (FISH), polymerázovú reťazovú reakciu (PCR) a analýzy Nanostring. Fúzie NTRK (ETV6 NTRK3) boli odvodené od pacientov s infantilným fibrosarkómom, ktorí vykazovali zdokumentovanú translokáciu ETV6 identifikovanú metódou FISH. Väčšina spomedzi 235 pacientov v klinickom skúšaní larotrectinibu so známym stavom fúzie NTRK bola testovaná metódami ngS.

V rámci štúdií NAVIGATE NCT02576431 a SCOUT NCT02637687 pokračuje registrácia pacientov. K hraničnému termínu získavania údajov (15. júla 2019) bolo zaregistrovaných 279 pacientov. Spomedzi 279 pacientov bolo 208 pozitívnych na fúziu NTRK. Spomedzi 208 pozitívnych pacientov 164 vytvorilo kohortu larotrectinib ePAS4.

Primárnym výstupom analýzy účinnosti larotrectinibu bola celková miera liečebnej odpovede (overall response rate, ORR) podľa hodnotenia nezávislej kontrolnej komisie (IRC) v rámci združeného súboru údajov z 3 klinických štúdií. Miera ORR bola hodnotená podľa pomeru pacientov s najlepšou celkovou mierou liečebnej odpovede (potvrdenou úplnou alebo čiastočnou odpoveďou na liečbu) podľa kritérií RECIST, verzia 1.1. Miera ORR pre larotrectinib v kohorte ePAS4 bola 72,6 % (95 % CI [65,1 %, 79,2 %]) a zahŕňala pacientov so 16 odlišnými typmi tumoru.

Počítanie vzoriek

Súbor vzoriek zahŕňal zastúpenie širokej škály typov tumorov a vzoriek od detských a dospelých pacientov.

K 15. júlu 2019 bolo do štúdie larotrectinibu zaregistrovaných 279 pacientov. Spomedzi nich vykazovalo 235 pacientov známy status fúzie NTRK stanovený metódou LT: 208 bolo pozitívnych a 27 negatívnych. V prípade 44 pacientov bol stav fúzie NTRK neznámy, keďže sa nevyžadovalo testovanie spôsobilosti pacientov vo fázach eskalácie dávky v štúdiách NCT02122913 a SCOUT NCT02637687. V prípade doplnkovej klinickej štúdie analýzy TSO Comprehensive (EU) boli vzorky od pacientov zúčastňujúcich sa klinického skúšania larotrectinibu, ktorí boli zaregistrovaní k 15. júlu 2019 so známym stavom fúzie NTRK (208 pozitívnych a 27 negatívnych pacientov) a doplnkové vzorky, ktoré boli pomocou reprezentatívnych metód LT kategorizované ako negatívne na fúziu NTRK, určené ako spôsobilé pre túto štúdiu.

Spomedzi 208 pozitívnych vzoriek z klinického skúšania larotrectinibu bolo 154 vzoriek dostupných na testovanie pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU). Spomedzi nich vykazovalo 138 platné výsledky. Pätnásť (15) vzoriek bolo negatívnych v dôsledku zlyhania metriky kvality sekvenovania vzoriek a 1 vzorka nebola testovaná v dôsledku odchýlky od protokolu. Spomedzi 27 negatívnych vzoriek z klinického skúšania larotrectinibu bolo 24 vzoriek dostupných na testovanie. Spomedzi nich vykazovalo 22 platné výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU). Dve vzorky boli neplatné v dôsledku zlyhania metriky kvality sekvenovania vzorky.

Pomocou jednej z dvoch reprezentatívnych metód LT bol vykonaný skríning doplnkových vzoriek. Dohromady bolo spracovaných viac než 350 vzoriek, ktoré boli analyzované z hľadiska obsahu tumoru. Spomedzi doplnkových vzoriek, ktoré spĺňali požiadavky na vzorky, bolo 266 vzoriek úspešne extrahovaných a reprezentatívnou metódou LT potvrdených ako negatívnych, pokiaľ ide o fúziu NTRK. Spomedzi nich bolo 260 dostupných na analytické testovanie TSO Comprehensive (EU), výsledkom ktorého bolo 222 platných výsledkov. 38 vzoriek bolo neplatných v dôsledku zlyhania metriky sekvenovania vzoriek (n = 25) alebo zlyhania sekvenovania vzoriek (n = 13). Celý súbor negatívnych vzoriek na fúziu NTRK sa skladal z 222 doplnkových vzoriek a 22 vzoriek z klinického skúšania larotrectinibu.

Výsledky konkordancie

Konkordanciu výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) a výsledkov metód LT s neplatnými výsledkami TSO Comprehensive (EU) a bez nich uvádza [Tabuľka 83](#).

Tabuľka 83 Doplnková klinická štúdia NTRK: Konkordancia medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódami LT pri detekcii fúzií NTRK

Miera zhody	Bez neplatných výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU)		S neplatnými výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU)	
	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI*	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI*
PPA	89,1 % (123/138)	82,7 % – 93,8 %	80,4 % (123/153)	73,2 % – 86,4 %
NPA	96,3 % (235/244)	93,1 % – 98,3 %	82,7 % (235/284)	77,8 % – 87,0 %
OPA	93,7 % (358/382)	90,8 % – 95,9 %	81,9 % (358/437)	78,0 % – 85,4 %

* Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti boli počítané pomocou (presnej) Clopper-Pearsonovej metódy.

Analýza citlivosti týkajúca sa chýbajúcich výsledkov analýzy TSO Comprehensive (EU) preukázala robustnosť analýzy zhody. Chýbajúce výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) pre pacientov pozitívnych na fúziu LT NTRK (n = 70) boli odvodené pomocou modelu logistickej regresie. Odhady zhody vrátane odvodených hodnôt uvádza [Tabuľka 84](#).

Tabuľka 84 Doplnková klinická štúdia NTRK: Konkordancia medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódami LT pri detekcii fúzií NTRK vrátane odvodených hodnôt pre pacientov pozitívnych podľa metódy LT s chýbajúcimi výsledkami analýzy TSO Comprehensive (EU)

Miera zhody	% zhody	95 % interval CI*
PPA	85,2 %	78,6 % – 91,7 %
NPA	96,3 %	93,9 % – 98,7 %
OPA	91,2 %	87,9 % – 94,5 %

Chýbajúce výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) pre pacientov negatívnych na fúziu podľa metódy LT neboli odvodené.

* Obojstranné intervaly spoľahlivosti 95 % boli počítané podľa metódy viacnásobného priradenia Boot. Metóda viacnásobného priradenia Boot je krok typu bootstrap vnorený do metódy Multiple Imputation (Schomaker a Heumann 2018).

Zhody medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódami LT podľa typu metódy (napríklad RNA ngS, FISH) uvádza [Tabuľka 85](#).

Tabuľka 85 Doplnková klinická štúdia NTRK: Konkordancia medzi analýzou TSO Comprehensive (EU) a metódami LT pri detekcii fúzií NTRK podľa typu metódy LT

Typ metódy LT	Miera zhody	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI ¹
DNA ngS	PPA	84,2 % (32/38)	68,7 % – 94,0 %
	NPA	88,9 % (16/18)	65,3 % – 98,6 %
	OPA	85,7 % (48/56)	73,8 % – 93,6 %
RNA ngS ²	PPA	91,5 % (75/82)	83,2 % – 96,5 %
	NPA	96,9 % (218/225)	93,7 % – 98,7 %
	OPA	95,4 % (293/307)	92,5 % – 97,5 %

Typ metódy LT	Miera zhody	Zhoda, % (n/N)	95 % interval CI ¹
FISH	PPA	80,0 % (8/10)	44,4 % – 97,5 %
	NPA	Nepočítané (1/1)	Nepočítané
	OPA	81,8 % (9/11)	48,2 % – 97,7 %
PCR	PPA	100,0 % (8/8)	63,1 % – 100,0 %
	NPA	Nepočítané (0/0)	Nepočítané
	OPA	100,0 % (8/8)	63,1 % – 100,0 %

Nepočítané: pre podskupiny s počtom vzoriek < 5 neboli štatistické údaje o zhode počítané.

¹ Obojstranné 95 % intervaly spoľahlivosti boli počítané pomocou (presnej) Clopper-Pearsonovej metódy.

² Zahŕňa metódy ngS, ktoré využívajú iba RNA a DNA a RNA.

Spomedzi 437 testovaných vzoriek pomocou analýzy TSO Comprehensive (EU) vykazovalo 24 z nich výsledky diskordantné s metódami LT: 15 bolo pozitívnych podľa metód LT a negatívnych podľa analýzy TSO Comprehensive (EU), a 9 bolo negatívnych podľa metód LT a pozitívnych podľa analýzy TSO Comprehensive (EU). Spomedzi 24 vzoriek s diskordantnými výsledkami bolo 8 testovaných pomocou metódy DNA ngS LT, 14 pomocou metódy RNA ngS LT a 2 pomocou metódy FISH.

Schválená nezávislá metóda NGS potvrdila výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) u 14 z 24 vzoriek s diskordantnými výsledkami. Pokiaľ ide o zvyšných 10 vzoriek, výsledky analýzy TSO Comprehensive (EU) boli diskordantné s metódou LT aj s nezávislou metódou ngS.

Výsledky klinickej účinnosti

V rámci kohorty ePAS4 bola účinnosť larotrectinibu v pozitívnej populácii podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a podľa LT (97 pacientov, ORR = 78,4 %, 95 % interval CI [68,8 %, 86,1 %]) podobná ako účinnosť larotrectinibu v celkovej populácii ePAS4 (164 pacientov, ORR = 72,6 %, 95 % interval CI [65,1 %, 79,2 %]) (Tabuľka 86). Spomedzi 97 pozitívnych pacientov podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) v kohorte ePAS4 dosiahlo 28 (28,9 %) pacientov úplnú odpoveď na liečbu/úplnú odpoveď na chirurgickú liečbu a 48 (49,5 %) pacientov dosiahlo čiastočnú reakciu.

Spomedzi 13 negatívnych pacientov podľa analýzy TSO Comprehensive (EU) a pozitívnych podľa metódy LT vykazoval 1 pacient (7,7 %) úplnú odpoveď na liečbu a 2 pacienti (15,4 %) vykazovalo čiastočnú odpoveď na liečbu pri liečbe larotrectinibom.

Tabuľka 86 Doplnková klinická štúdia NTRK: Celková miera liečebnej odpovede (ORR) pacientov pozitívnych podľa metódy LT a analýzy TSO Comprehensive (EU) – výsledky v kohorte ePAS4

		Pozitívni na fúziu podľa metódy LT N = 164	TSO Comprehensive (EU) Pozitívni a pozitívni podľa metódy LT n = 97	TSO Comprehensive (EU) Negatívni a pozitívni podľa metódy LT n = 13
Najlepšia celková odozva na liečbu, n (%)	Úplná odozva	31 (18,9 %)	22 (22,7 %)	1 (7,7 %)
	Úplná odozva na chirurgickú liečbu	8 (4,9 %)	6 (6,2 %)	0
	Čiastočná odozva na liečbu	80 (48,8 %)	48 (49,5 %)	2 (15,4 %)
	Stabilné ochorenie	25 (15,2 %)	13 (13,4 %)	4 (30,8 %)
	Progresívne ochorenie	13 (7,9 %)	6 (6,2 %)	5 (38,5 %)
	Nemožné hodnotiť	7 (4,3 %)	2 (2,1 %)	1 (7,7 %)
Celková miera odozvy na liečbu	Počet pacientov, n	164	97	13
	Počet pacientov s CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR % (95 % CI*)	72,6 % (65,1 %, 79,2 %)	78,4 % (68,8 %, 86,1 %)	23,1 % (5,0 %, 53,8 %)

Skratky: CR = úplná odozva na liečbu, PR = čiastočná odozva na liečbu, sCR = úplná odozva na chirurgickú liečbu.

* Obojstranný 95 % interval spoľahlivosti bol počítaný pomocou (presnej) Clopper-Pearsonovej metódy.

54 pacientov vykazovalo chýbajúce výsledky podľa analýzy TSO Comprehensive (EU).

Údaje z tejto štúdie potvrdzujú bezpečnosť a účinnosť analýzy TSO Comprehensive (EU) pri identifikácii pacientov s tuhými tumormi s fúziami NTRK, ktorí môžu byť spôsobilí na liečbu larotrectinibom.

Referencie

1. American Society of Clinical Oncology. www.asco.org. Accessed October 3 2016.
2. European Society for Medical Oncology. www.esmo.org. Accessed October 3 2016.

História revízií

Revízia	Dátum	Opis zmeny
v06	február 2023	<ul style="list-style-type: none"> • Ďalšie informácie v časti Obmedzenia • Jazykové aktualizácie (konvencie, gramatika a zreteľnosť textu) • Oprava tabuliek 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Informácie o prítomnosti usadenín v reagenzii FSM • Aktualizovali sa špecifikácie tepelného cyklovača a žliabku v zozname vybavenia a materiálov
v05	september 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Pridali sa čísla položiek analytického modulu TSO Comprehensive v2.3.5 • Odstránili sa čísla položiek analytického modulu TSO Comprehensive v2.3.3 • Aktualizovala sa terminológia v časti Limit blanku
v04	jún 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Pridali sa čísla položiek analytického modulu TSO Comprehensive v2.3.5 • Odstránili sa čísla položiek analytického modulu TSO Comprehensive v2.3.3 • Aktualizovala sa terminológia v časti Limit blanku
v03	apríl 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Pridali sa charakteristiky účinnosti súvisiace s fúziami NTRK • Pridalo sa označenie IBA NA EXPORT • Aktualizovala sa časť s účelom určenia – pridanie predpokladu NTRK1-3 CDx • Rozšírili sa informácie o komponentoch produktu a zahrnuli sa čísla položiek softvérových komponentov
v02	február 2022	<ul style="list-style-type: none"> • Bola opravená chyba odkazu na tabuľku • Pridali sa obmedzenia súvisiace so zárodočnými a somatickými variantmi • Objasnilo sa znenie textu o detekcii amplifikácie génov
v01	december 2021	<ul style="list-style-type: none"> • Aktualizovali sa obmedzenia postupu • Objasnili sa špecifikácie magnetického stojana a tepelného cyklovača v zozname vybavenia a materiálov
v00	november 2021	Úvodné vydanie

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním výrobku (výrobkov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument a jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovať akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu popísaného výrobku (výrobkov). Pred použitím takéhoto výrobku (výrobkov) je nutné prečítať si celý obsah tohto dokumentu s porozumením.

NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH POKYNOV TU OBSIAHNUÝCH A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE VÝROBKU (VÝROBKOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽIVATELOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA VÝROBKOV (VÝROBKOVY).

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU UVÁDZANÝCH PRODUKTOV (VRÁTANE SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).

© 2023 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktné informácie



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov súpravy na stránke support.illumina.com na karte *Documentation* (Dokumentácia).