

TruSight Oncology Comprehensive (ЄС)

Інструкція з використання

ВИКОРИСТОВУВАТИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO. ЛИШЕ ДЛЯ ЕКСПОРТУ.

Передбачене використання

Комплексний тест TruSight™ Oncology Comprehensive (ЄС) — це діагностичний тест *in vitro*, в якому використовується цільове секвенування наступного покоління для виявлення варіантів у 517 генах з використанням нуклеїнових кислот, отриманих зі зразків пухлинної тканини, зафіксованих у формаліні та залитих парафіном (FFPE), взятих від онкопациєнтів із солідними злоякісними новоутвореннями, з використанням приладу Illumina® NextSeq™ 550Dx. Тест можна застосовувати для виявлення одонуклеотидних варіантів, багатонуклеотидних варіантів, інсерцій, делецій та ампліфікації генів із ДНК, а також злиття генів і варіантів сплайсингу з РНК. Тест також повідомляє про оцінку мутаційного навантаження пухлини (TMB) та статус мікросателітної нестабільності (MSI).

Тест призначений для супутньої діагностики з метою виявлення онкологічних пацієнтів для лікування цільовою терапією, яку наводить [Таблиця 1](#), відповідно до затвердженої інструкції з медичного застосування лікарського засобу. Крім того, тест призначений для надання інформації про профілювання пухлини для використання кваліфікованими медичними працівниками відповідно до професійних рекомендацій і не є остаточним або обов'язковим для використання будь-якого конкретного терапевтичного продукту за призначенням.

Таблиця 1 Показання до застосування супутньої діагностики

Тип пухлини	Біомаркери	Цільова терапія
Солідні пухлини	Злиття генів NTRK1, NTRK2 і NTRK3	VITRAKVI® (ларотректиніб)

Зведена інформація та пояснення аналізу

Клінічний опис

Рак є провідною причиною смерті в усьому світі та потенційно може утворюватися в будь-якій тканині.^{1, 2} Генетичний аналіз ракової основи є важливим для виявлення пацієнтів, які можуть отримати користь від таргетної терапії, та для розробки нових методів лікування. Численні гени причетні до розвитку або прогресування раку, і багато видів раку несуть різні варіанти, що впливають на ці гени та їх функції. Ці варіанти можуть включати мутації генів, такі як одонуклеотидні варіанти (SNV), багатонуклеотидні варіанти (MNV), інсерції або делеції, ампліфікації генів, злиття генів і варіанти сплайсингу. Іншим

наслідком мутацій ракових генів є поява неоантигенів, які можуть викликати специфічні для раку імунні відповіді. Мутаційний стан раку може бути представлений TMB і MSI, які є геномними сигнатурами, пов'язаними з геномною нестабільністю і проявом ракових неоантигенів.

TruSight Oncology Comprehensive — це якісний аналіз комплексного геномного профілювання (NGS) секвенування нового покоління (CGP), який комплексно оцінює геномні варіанти у великій панелі генів, пов'язаних із раком (Таблиця 2). Аналіз виявляє невеликі варіанти в 517 генах, а також ампліфікації, злиття та варіанти сплайсингу генів, як зазначає Таблиця 2. Аналіз забезпечує кодувальне покриття послідовності для всіх генів, за винятком TERT, де охоплюється тільки промоторна область, і оцінює оцінку TMB і статус MSI. Ці цілі аналізу включають вміст, на який посилаються професійні організації та інші основні рекомендації США. Незалежні публікації консорціуму та пізні фармацевтичні дослідження також вплинули на дизайн аналізу TSO Comprehensive.

Список областей, виключених з розпізнавання варіантів, див. у *Переліку блоків TruSight Oncology Comprehensive (документ No 200009524)*, на сайті служби підтримки Illumina.

Нижче (Таблиця 2) наведено такі категорії типів варіантів: малий варіант ДНК (S), ампліфікація гена (A), злиття (F) і варіант сплайсингу (Sp). Малі варіанти ДНК включають SNV, MNV, а також інсерції та делеції.

Таблиця 2 TSO Comprehensive (ЄС). Панель генів аналізу

№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S

№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта
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	ПОЛЕ	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	TKB	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

№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта
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	POA	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	ЦОВБПА	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S

№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта
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	ЛИН	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TEPK	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	TBOP	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

№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта	№	Ідентифікатор Entrez	Ген	Тип варіанта
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д

Принципи виконання процедури

Аналіз TSO Comprehensive (ЄС) являє собою розподілений тест, який виконується вручну з використанням виділеної нуклеїнової кислоти як вхідного матеріалу. ДНК та/або РНК, виділені з зафіксованої у формаліні і залитої парафіном (FFPE) тканини, використовують для приготування бібліотек, які потім збагачують генами, пов'язаними з раком, і секвенують на NextSeq 550Dx.

Аналіз TSO Comprehensive (ЄС) включає наступні процеси.

- **Library Preparation and Enrichment** (Підготовка та збагачення бібліотеки) — РНК загальною кількістю 40 нг перетворюють на дволанцюгову комплементарну ДНК (кДНК). Для геномної ДНК (гДНК) 40 нг гДНК змішують у невеликі фрагменти. Універсальні адаптери для секвенування лігують на фрагменти кДНК і гДНК. Послідовності адаптерів P5 і P7 включені в кожен бібліотеку, щоб забезпечити захоплення фрагментів бібліотеки на поверхні проточної кювети під час секвенування. Адаптери включають послідовності індексів i5 і i7 для ідентифікації кожного окремого зразка і, у випадку бібліотек зі зразків гДНК, окремі молекули з використанням унікальних молекулярних ідентифікаторів (UMI). Потім бібліотеки збагачуються специфічними генами, що цікавлять, за допомогою методу на основі захоплення. Послідовності біотинільованих зондів, які охоплюють ділянки генів, що становлять інтерес, на які впливає аналіз, гібридизуються з бібліотеками. Зонди та гібридизовані цільові бібліотеки ізолюють від нецільових бібліотек шляхом захоплення магнітними частинками стрептавідину. Цільові збагачені бібліотеки вимиваються та ампліфікуються. Кількість кожної збагаченої бібліотеки потім нормалізується за допомогою методу на основі гранул, щоб забезпечити рівне представлення в об'єднаних бібліотеках для секвенування.
- **Sequencing and Primary Analysis** (Секвенування та первинний аналіз) — нормалізовані, збагачені бібліотеки об'єднували та кластеризували на проточній кюветі, а потім секвенували за допомогою секвенування за допомогою біохімічного аналізу синтезу (SBS) на NextSeq 550Dx. У хімічній реакції SBS використовується метод оборотних термінаторів для виявлення окремих флуоресцентно-мічених дезоксинуклеотидтрифосфатних (dNTP) основ, тому що їх включено в нитки ДНК, які зростають. Під час кожного циклу секвенування в ланцюг нуклеїнових кислот додають один dNTP. Етикетка dNTP слугує обмежувачем полімеризації. Після кожної реєстрації dNTP флуоресцентний барвник візуалізують для ідентифікації основи, а потім розщеплюють для забезпечення включення наступного нуклеотиду. Чотири dNTP (A, G, T і C), зв'язані з оборотним термінатором, присутні у вигляді окремих окремих молекул. У результаті природна конкуренція мінімізує помилку включення. Під час первинного аналізу розпізнавання основ здійснюється безпосередньо з вимірювань інтенсивності сигналу під час кожного циклу секвенування, в результаті чого секвенування здійснюється послідовно, основа за основою. Кожному визначеній основі призначається оцінка якості.
- **Secondary Analysis** (Вторинний аналіз) — Модуль аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) є частиною програмного забезпечення Local Run Manager на приладі NextSeq 550Dx. Модуль полегшує налаштування роботи TSO Comprehensive (ЄС) та виконує вторинний аналіз результатів секвенування. Вторинний аналіз включає в себе валідацію обробки прогону та контролю якості, а потім демультіплексію, створення файлу FASTQ, вирівнювання та

розпізнавання варіантів. Демультіплексування відокремлює дані від об'єднаних бібліотек на основі унікальних індексів послідовностей, які були додані під час процедури підготовки бібліотеки. Створюються проміжні файли FASTQ, які містять результати секвенування для кожного зразка та оцінки якості, за винятком з будь-яких кластерів, які не пройшли фільтр. Зчитування секвенування потім вирівнюють відносно еталонного генома для ідентифікації зв'язку між послідовностями та присвоюють бал на основі ділянок подібності. Узгоджені показники записуються у файли у форматі BAM. Програмне забезпечення для аналізу використовує окремі алгоритми для бібліотек, згенерованих зі зразків ДНК та/або РНК, щоб розпізнавати малі варіанти ДНК, ампліфікації генів, TMB та MSI для зразків ДНК, а також варіанти злиття та сплайсингу для зразків РНК. Модуль програмного забезпечення для аналізу генерує кілька вихідних даних, включаючи показники секвенування та файли у форматі Variant Call Format (VCF). Файли VCF містять інформацію про варіанти, знайдені в конкретних позиціях референсного генома. Для кожного зразка створюються показники послідовності та окремі вихідні файли. Для отримання детальної інформації про вторинний та третинний аналіз див. *Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200008661)*.

- **Tertiary Analysis** (Третинний аналіз) — третинний аналіз, який виконує Модуль аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EC), складається з розрахунків TMB та MSI, супутніх діагностичних розпізнавань, профілювання варіантів пухлин за двома рівнями клінічної значущості з використанням бази знань (KB) та типу тканини, а також створення звіту про результати. Профілювання пухлини також може називатися комплексним геномним профілюванням. Інтерпретовані результати аналізу варіантів та результати аналізу на MCH та біомаркери MSI узагальнені у звіті про результати TSO Comprehensive (EC).

Обмеження процедури

Використовувати лише для діагностики *in vitro*.

- Проводиться лише за призначенням лікаря. Тест повинен використовуватися відповідно до клінічних лабораторних норм.
- Геномні дані цільового застосування ([Таблиця 2](#)) не є обов'язковими або остаточними для застосування будь-якого конкретного терапевтичного продукту згідно з інструкцією.
- Для варіантів, перелічених у звіті про результати TSO Comprehensive (EC) у розділах «Результати геномних досліджень із ознаками клінічної значущості» (рівень 2) та «Результати геномних досліджень із потенційною клінічною значущістю» (рівень 3), клінічна валідація не проводилася.
- Рішення щодо догляду та лікування пацієнтів повинні ґрунтуватися на незалежному медичному висновку лікуючого лікаря з урахуванням усієї застосовної інформації про стан пацієнта, такої як історія хвороби пацієнта та його родини, фізикальні обстеження, інформація з інших діагностичних тестів та вподобання пацієнта, відповідно до стандартів лікування у певному регіоні.

- Якість зразка FFPE сильно змінюється. Зразки, які не пройшли стандартні процедури фіксації, можуть не утворювати екстраговані нуклеїнові кислоти, які відповідають вимогам контролю якості аналізу ([Контроль якості на стор. 87](#)). Блоки FFPE, які зберігалися довше п'яти років, продемонстрували меншу валідність.
- Ефективність TSO Comprehensive (ЄС) на зразках, отриманих у пацієнтів, яким було виконано трансплантацію органів або тканин, не оцінювалася.
- Висока кількість некротичної тканини ($\geq 23\%$) може впливати на здатність аналізу TSO Comprehensive (ЄС) виявляти ампліфікації генів і злиття РНК.
- Виявлення мутації соматичного драйвера може бути ненадійним, якщо вміст пухлини (за площею) становить менше 20 %.
- Показник мікросателітної стабільності (MS-Stable) може бути ненадійним, якщо вміст пухлини становить менше 30 %. Показник високої мікросателітної нестабільності (MSI-High) є правильним незалежно від вмісту пухлини.
- Гемоглобін, пов'язаний із тканинами, знижує показники для варіантів сплайсингу MET.
- У високоорганізованих геномах із делеціями та втратою гетерозиготності програмне забезпечення TSO Comprehensive (ЄС) може помилково класифікувати зразок ДНК як забруднений (CONTAMINATION_SCORE > 3106 і р-значення > 0,049).
- Негативний результат не виключає наявності мутації нижче межі виявлення (LoD) тесту.
- На чутливість до виявлення малих варіантів ДНК можуть впливати:
 - геномний контекст низької складності;
 - збільшення довжини варіанта.
- Бали TMB можуть бути неточними в таких контекстах:
 - коли вміст пухлини досягає рівнів, де сходяться зародкова та соматична частота алелів (VAF);
 - у популяціях, які погано представлені в загальнодоступних базах даних.
- Ампліфікація генів — це єдина варіація числа копій, про яку повідомляє TSO Comprehensive (ЄС). Аналіз не повідомляє про делеції генів.
- Алгоритми розпізнавання злиттів у програмному забезпеченні для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) можуть не враховувати докази зі зчитувань, які виходять за межі анотаційних генів.
- Це може вплинути на чутливість до виявлення поєднаних зображень:
 - через низьку складність бібліотеки, що призводить до зменшення підтверджувальних показників через відхилення в робочому процесі аналізу (наприклад, виконайте кроки змішування в розділі [Денатурація та відпал РНК на стор. 46](#));
 - коли один ген охоплює обидві точки розриву;
 - У випадках, коли декілька точок розриву злиття знаходяться в безпосередній близькості один від одного з одним або декількома партнерами, декілька точок розриву та партнерів можуть бути зареєстровані як одна точка розриву та партнер;

- за маленькими медіанними розмірами вкладки; мінімальний медіанний розмір вставки становить 80 п. о., але чутливість зменшується в діапазоні 80–100 п. о.;
- через низьку складність послідовності або гомологічний геномний контекст навколо точок розриву злиття.
- Роздільна здатність генів, що беруть участь у злитті, може бути порушена, коли точки розриву злиття виникають у геномних ділянках, що містять перекриваючі гени. Якщо декілька генів перекривають точку розриву, під час аналізу будуть зареєстровані всі гени, обмежені крапкою з комою.
- Невідповідне покриття в області промотора TERT може призвести до відсутності результату через низьку глибину.
- Помилки анотації або бази знань можуть призвести до хибнопозитивного або хибнонегативного результату, у тому числі включення переліку варіантів на неправильному рівні (між геномними результатами з ознаками клінічної значущості [рівень 2] та геномними результатами з потенційною клінічною значущістю [рівень 3]), або інформація про анотації у звіті може бути неправильною. Помилки анотацій або бази знань не впливають на варіанти, зареєстровані в результатах CDx. Існує ймовірність помилки з таких трьох джерел:
 - TSO Comprehensive (ЄС) анотація варіанта. Частота похибки становить приблизно 0,0027 % на основі аналізу 2 448 350 варіантів із COSMIC версії 92, тому існує низька ймовірність помилки.
 - Помилка бази знань через процес курування.
 - Актуальність вмісту бази знань змінюється з часом. Звіт відображає знання на момент курування версії бази знань.
- TSO Comprehensive (ЄС) призначений для повідомлення про соматичні варіанти при повідомленні про варіанти з доказами клінічної значущості або варіанти з потенційною клінічною значущістю. Оскільки аналіз призначений виключно для пухлин, повідомлення про зародкові (спадкові) варіанти можливе, але ненавмисне. TSO Comprehensive (ЄС) використовує базу знань для повідомлення про варіанти без чіткого зазначення, чи мають вони зародкове або соматичне походження.
- База знань включає тільки терапевтичні, діагностичні та прогностичні зв'язки, які стосуються варіантів, присутніх у встановленій солідній злоякісній пухлині. Зв'язки між чутливістю або ризиком розвитку раку не включені до бази знань.
- У таблиці нижче показано зміни нуклеотидів для трьох варіантів RET, які аналіз виявити не може. Інші нуклеотидні зміни для цієї ж зміни амінокислоти виявити можна.

Таблиця 3 Зміни нуклеотиду для трьох варіантів RET

Зміна рівня амінокислоти	Chr*	Позиція	Контрольний алель	Альтернативний варіант
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGC C	TAAGGCCG
				TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA
				CAAAGAGA
				CAAAAAGG
				CCAAAAGG
				CTAAGAGG

* Chr = хромосома

Компоненти виробу

Аналіз TSO Comprehensive (ЄС) складається з таких компонентів:

- Набір TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (номер за каталогом Illumina 20063092) — набір містить реагенти з достатнім об'ємом для створення 24 бібліотек ДНК і 24 бібліотек РНК. Цей об'єм включає зразки пацієнтів та контролю. Контролі продаються окремо (див. розділ [Потрібні реагенти, яких немає в комплекті на стор. 18](#)).
- База знань: регулярно оновлювана й доступна для завантаження на порталі Illumina Lighthouse Portal.
- Модуль аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (IlluminaНомер за каталогом 20051843), що включає такі компоненти:
 - Пакет заявлених характеристик TSO Comprehensive
 - Програмний комплекс TSO Comprehensive
 - Комплект USB для TSO Comprehensive

Представник служби підтримки Illumina встановлює Модуль аналізу TSO Comprehensive (ЄС) Local Run Manager NextSeq 550Dx instrument відповідної версії на. Для отримання інформації про модуль аналізу див. Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (документ № 200008661).

Реагенти

Реагенти в комплекті

Наступні реагенти постачаються з набором TSO Comprehensive (ЄС).

Набір для підготування бібліотеки РНК TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Реагент	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Активні фармацевтичні складники	Температура зберігання
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 мкл	Буферний водний розчин, який містить солі та нуклеотиди	Від -25 °С до -15 °С
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 мкл	Буферний водний розчин, який містить солі, ДНК-полімеразу, РНКазу H та нуклеотиди	Від -25 °С до -15 °С
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 мкл	Буферний водний розчин, який містить солі та випадкові гексамери	Від -25 °С до -15 °С
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 мкл	Буферний водний розчин, який містить зворотну транскриптазу	Від -25 °С до -15 °С

TruSight Oncology Comp Library Prep (заморожування), PN 20031118

Реагент	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Активні фармацевтичні складники	Температура зберігання
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 мкл	Буферний водний розчин, що містить ДНК-полімеразу T4 і полінуклеотидну кіназу	Від -25 °C до -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 мкл	Буферний водний розчин, який містить солі та нуклеотиди	Від -25 °C до -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 мл	Буферний водний розчин, який містить солі	Від -25 °C до -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 мкл	Буферний водний розчин, який містить лігазу	Від -25 °C до -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 мкл	Буферний водний розчин, який містить універсальні олігонуклеотиди для секвенування	Від -25 °C до -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 мкл	Буферний водний розчин, який містить універсальні олігонуклеотиди для секвенування	Від -25 °C до -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 мкл	Буферний водний розчин, який містить солі	Від -25 °C до -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 мкл	Буферний водний розчин, який містить DNA polymerase та нуклеотиди	Від -25 °C до -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (охолодження), Арт. 20031119

Реагент	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Активні фармацевтичні складники	Температура зберігання
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 мл	Буферний водний розчин, який містить солі	Від 2 °C до 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 мл	Водний розчин, який містить магнітні гранули	Від 2 °C до 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 мл	Розчин Tris EDTA	Від 2 °C до 8 °C

Набір індексних праймерів TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

Активні фармацевтичні складники: буферний водний розчин, що містить окремо штрихкоди олігонуклеотидних праймерів.



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для зразків РНК або ДНК використовуйте унікальні індексні праймери (UPxx). Не поєднуйте праймери індексів CPxx та UPxx в одній бібліотеці.

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

Набір індексних праймерів TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Активні фармацевтичні складники: буферний водний розчин, що містить окремо штрихкоди олігонуклеотидних праймерів.



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Використовуйте праймери Combinatorial Index Primers (CPxx) лише для зразків ДНК. Не поєднуйте праймери індексів CPxx та UPxx в одній бібліотеці.

Праймер індексу	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Індекс i7	Послідовність	Індекс i5	Послідовність	Температура зберігання
CP01	20031461	1	20 мкл	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	Від -25 °C до -15 °C
CP02	20031462	1	20 мкл	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	Від -25 °C до -15 °C
CP03	20031463	1	20 мкл	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	Від -25 °C до -15 °C
CP04	20031464	1	20 мкл	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	Від -25 °C до -15 °C
CP05	20031465	1	20 мкл	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	Від -25 °C до -15 °C
CP06	20031466	1	20 мкл	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	Від -25 °C до -15 °C
CP07	20031467	1	20 мкл	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	Від -25 °C до -15 °C
CP08	20031468	1	20 мкл	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	Від -25 °C до -15 °C
CP09	20031469	1	20 мкл	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	Від -25 °C до -15 °C
CP10	20031470	1	20 мкл	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	Від -25 °C до -15 °C
CP11	20031471	1	20 мкл	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	Від -25 °C до -15 °C
CP12	20031472	1	20 мкл	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	Від -25 °C до -15 °C
CP13	20031473	1	20 мкл	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	Від -25 °C до -15 °C
CP14	20031474	1	20 мкл	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	Від -25 °C до -15 °C
CP15	20031475	1	20 мкл	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	Від -25 °C до -15 °C
CP16	20031476	1	20 мкл	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	Від -25 °C до -15 °C

Набір TruSight Oncology Comp Enrichment (охоłodжений), PN 20031123

Реагент	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Активні фармацевтичні складники	Температура зберігання
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 мкл	Буферний водний розчин, який містить формамід та солі	Від 2 °C до 8 °C

Реагент	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Активні фармацевтичні складники	Температура зберігання
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 мл	Буферний водний розчин, який містить солі та тверді парамагнітні гранули, ковалентно покриті стрептавідином	Від 2 °C до 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 мкл	Розчин гідроксиду натрію	Від 2 °C до 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 мкл	Буферний водний розчин	Від 2 °C до 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 мл	Буферний водний розчин, який містить твердофазні парамагнітні гранули	Від 2 °C до 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 мл	Буферний водний розчин, який містить солі, 2-меркаптоетанол і формамід	Від 2 °C до 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 мл	Буферний водний розчин, який містить солі	Від 2 °C до 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 мл	Буферний водний розчин, який містить солі	Від 2 °C до 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 мл	Водний розчин, який містить магнітні гранули	Від 2 °C до 8 °C

Набір TruSight Oncology Comp Enrichment (заморожений), PN 20031121

Реагент	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Активні фармацевтичні складники	Температура зберігання
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 мкл	Буферний водний розчин, який містить олігонуклеотиди	Від -25 °C до -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 мл	Буферний водний розчин, який містить солі	Від -25 °C до -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 мл	Буферний водний розчин, який містить детергент	Від -25 °C до -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 мкл	Буферний водний розчин, який містить DNA polymerase та нуклеотиди	Від -25 °C до -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 мкл	Буферний водний розчин, який містить праймери P5 і P7	Від -25 °C до -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 мл	Буферний водний розчин, який містить солі, 2-меркаптоетанол і формамід	Від -25 °C до -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 або PhiX)	20031492	1	10 мкл	Буферний водний розчин, який містить геномну ДНК PhiX	Від -25 °C до -15 °C

Набір TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Реагент	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Активні фармацевтичні складники	Температура зберігання
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 мкл	Пул олігонуклеотидних зондів	Від -25 °C до -15 °C

Реагент	Номер компонента	Кількість	Об'єм	Активні фармацевтичні складники	Температура зберігання
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 мкл	Пул олігонуклеотидних зондів	Від -25 °C до -15 °C

Потрібні реагенти, яких немає в комплекті

Реагенти попередньої ампліфікації

- Реагенти для екстрагування та очищення ДНК і РНК — див. вимоги до реагентів у розділі [Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот на стор. 29](#).
- Реагенти для кількісного аналізу ДНК і РНК — див. вимоги до реагентів у розділі [Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот на стор. 29](#).
- Контролі TruSight Oncology:
 - Набір контрольних зразків ДНК TruSight Oncology DNA Control (номер за каталогом Illumina 20065041)
 - Набір контрольних зразків РНК TruSight Oncology RNA Control (номер за каталогом Illumina 20065042)
- Етанол (EtOH), 100 % (міцність 200), для молекулярно-біологічного застосування
- Вода без вмісту-РНКаз/ДНКаз

Реагенти для постаампліфікації

- Набір реагентів NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 циклів) (Illumina® за каталогом 20028871)
 - Картридж NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 циклів)
 - Картридж із реагентами NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 циклів)
 - Картридж із буферами NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 циклів)
- Етанол, 100 % (міцність 200), для молекулярно-біологічного застосування
- Вода без вмісту РНКаз/ДНКаз-

Зберігання реагентів та поводження з ними

Наступні коробки з реагентами надсилаються в замороженому стані. Зберігати за температури від -25 °C до -15 °C.

Коробка	Номер компонента	Лабораторна зона
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Попередня ампліфікація
TruSight Oncology Comp Library Prep (заморожування)	20031118	Попередня ампліфікація
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Попередня ампліфікація
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Попередня ампліфікація
TruSight Oncology Comp Enrichment (заморожування)	20031121	Після ампліфікації
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Після ампліфікації

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

Не зберігайте реагенти в холодильному відділенні або у дверцятах холодильника.

Наступні коробки з реагентами надсилаються на гелевих пакетах для підтримання температури від 0 °C до 10 °C. Зберігати за температури від 2 °C до 8 °C.

Коробка	Номер компонента	Лабораторна зона
TruSight Oncology Comp Library Prep (охолодження)	20031119	Попередня ампліфікація
TruSight Oncology Comp Enrichment (охолодження)	20031123	Після ампліфікації

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

Не заморожуйте реагенти, що містять гранули (LNB1, SPB і SMB).

- Зміни в зовнішньому вигляді реагентів можуть указувати на псування матеріалів. У разі змінення зовнішнього вигляду (наприклад, очевидного змінення кольору реагентів або їхнього помутніння) реагенти використовувати заборонено.
- FSM, SSM, ERA1-B і TCB1 можуть мати гранули, пов'язані з препаратом. Дотримуйтеся конкретних вказівок щодо обробки кожного реагенту. Після виконання етапів змішування FSM і SSM залишки білих частинок, пов'язаних із продуктом, не вплинуть на ефективність.

- Стабільність аналізу TSO Comprehensive (ЄС) оцінювалася, а ефективність була продемонстрована для щонайбільше чотирьох застосувань набору. Реагенти є стабільними за умови зберігання за зазначених температур до завершення терміну придатності, указанного на етикетках коробки.

Обладнання й матеріали

Потрібне обладнання й матеріали, що не надаються

Преампліфікаційне обладнання та матеріали

Обладнання	Постачальник
Ультразвуковий апарат з відповідними аксесуарами Див. розділ Налаштування конфігурації ультразвукового апарата для фрагментації ДНК на стор. 25 .	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Ампліфікатор (термоциклер) з наведеними далі характеристиками. • Кришка з підігрівом, яку можна встановити на 30°C і 100°C (або вимкнути, якщо не можна на 30°C) • Діапазон температур від 4 °C до 99 °C • Точність температури до $\pm 0,25$ °C • Сумісність з 96-лунковими планшетами для ПЛР, 0,2 мл • Див. розділ Швидкість нарощування/зменшення температури термоциклера на стор. 27	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Вихрова мішалка	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Інкубатори мікроразків (2) зі вставками для 96-лункових планшетів MIDI (2)	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Мікроцентрифуга	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Центрифуга з планшетом з наведеними далі характеристиками: • Сумісність з 96-лунковими мікропланшетами • Здатна витримувати 280 g (+/- 10 %)	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Струшувач планшета з указаними далі характеристиками: • Орбіта 2 мм • Можливе струшування на 1200 об/хв і 1800 об/хв	Постачальник загальнолабораторного обладнання

Обладнання	Постачальник
Герметичний клин або ролик	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Магнітна підставка з такими характеристиками: - Розроблено для осадження/розділення парамагнітних гранул - Магніти збоку стійки (не знизу) - Сумісність із 96-лунковими планшетами MIDI	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Прецизійні піпетки, здатні точно дозувати об'єми від 2 мкл до 1000 мкл з такими характеристиками: - Одноканальна або багатоканальна піпетка з кроком 0,02 мкл - Одноканальна або багатоканальна піпетка з кроком 0,1 мкл, 0,2 мкл або 0,5 мкл - Одноканальна або багатоканальна піпетка з кроком 1 мкл або 2 мкл Піпетки слід регулярно та точно калібрувати в межах 5% від зазначеного об'єму.	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Піпетковий дозатор	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Лід або холодний блок	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Серологічні піпетки, 10 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Клейкі ущільнювачі для планшетів на 96 лунок з указаними далі характеристиками: - Знімаються - Підходять для ПЛР- планшетів з бортиками або напівбортиками. - Міцний клей, який витримує численні перепади температури від -20°C до 100°C - Без ДНКаз/РНКаз	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Пробірки Microcentrifuge ємністю 1,7 мл без нуклеаз	Постачальник загальнолабораторного обладнання

Обладнання	Постачальник
Резервуари для реагенту без нуклеаз (одноразовий жолоб, 50 мл) (або еквівалент)	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Конічні пробірки на 15 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Конічні пробірки на 50 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Сумісні аерозоль-стійкі наконечники піпеток	Постачальник загальнолабораторного обладнання
96-лункові планшети для зберігання, 0,8 мл (MIDI-планшети)	Fisher Scientific, артикул № AB-0859 або еквівалент
96-лункові планшети для ПЛР, сумісні з термоциклером, 0,2 мл (поліпропіленові лунки)	Постачальник загальнолабораторного обладнання

Обладнання та матеріали після ампліфікації

Обладнання	Постачальник
Прилад NextSeq 550Dx	Illumina, № 20005715 за каталогом
Центрифуга з планшетом з наведеними далі характеристиками: - Сумісність з 96-лунковими мікропланшетами - Здатна витримувати 280 g (+/- 10 %)	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Ампліфікатор (термоциклер) з наведеними далі характеристиками. - Кришка з підігрівом(100 °C) - Діапазон температур від 4 °C до 99 °C - Точність температури до ±0,25 °C - Сумісність з 96-лунковими планшетами для ПЛР, 0,2 мл - Див. Швидкість нарощування/зменшення температури термоциклера на стор. 27	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Вихрова мішалка	Постачальник загальнолабораторного обладнання

Обладнання	Постачальник
Інкубатор мікрорізків із вставкою для 96-лункових планшетів MIDI	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Сухий термоблок з наступними характеристиками: - Діапазон температур від 25 °C до 99 °C - Точність температури до ± 5 °C - Переконайтеся, що мікроцентрифужні пробірки сумісні з термоблоком	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Струшувач планшета з указаними далі характеристиками: - Орбіта 2 мм - Можливе струшування на 1200 об/хв і 1800 об/хв	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Мікроцентрифуга	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Герметичний клин або ролик	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Магнітна підставка з такими характеристиками: - Розроблено для осадження/розділення парамагнітних гранул - Магніти збоку стійки (не знизу) - Сумісність із 96-лунковими планшетами MIDI	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Прецизійні піпетки, здатні точно дозувати від 2 мкл до 1000 мкл з такими характеристиками: - Одноканальна або багатоканальна піпетка з кроком 0,02 мкл - Одноканальна або багатоканальна піпетка з кроком 0,1 мкл, 0,2 мкл або 0,5 мкл - Одноканальна або багатоканальна піпетка з кроком 1 мкл або 2 мкл Піпетки слід регулярно та точно калібрувати в межах 5% від зазначеного об'єму.	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Піпетковий дозатор	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Серологічні піпетки, 10 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання

Обладнання	Постачальник
Клейкі ущільнювачі для планшетів на 96 лунок з указаними далі характеристиками: - Знімаються - Підходять для ПЛР-планшетів з бортиками або напівбортиками - Міцний клей, який витримує численні перепади температури від -20°C до 100°C - Без ДНКази/РНКази	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Пробірки Microcentrifuge ємністю 2 мл без нуклеаз	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Пробірки Microcentrifuge ємністю 1,7 мл без нуклеаз	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Резервуари для реагенту без нуклеаз (одноразовий жолоб, 50 мл) (або еквівалент)	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Конічні пробірки на 15 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Конічні пробірки на 50 мл	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Сумісні аерозоль-стійкі наконечники піпеток	Постачальник загальнолабораторного обладнання
96-лункові планшети для зберігання, 0,8 мл (MIDI-планшети)	Fisher Scientific, артикул № AB-0859 або еквівалент
96-лункові планшети для ПЛР, сумісні з термоциклером, 0,2 мл (поліпропіленові лунки)	Постачальник загальнолабораторного обладнання
Лід або холодний блок	Постачальник загальнолабораторного обладнання

Налаштування конфігурації ультразвукового апарата для фрагментації ДНК

Фрагментація ДНК, або зсув, впливає на ефективність аналізу, визначаючи розподіл розмірів фрагментів, що, у свою чергу, впливає на охоплення секвенування. Було оцінено та оптимізовано декілька конфігурацій цілеспрямованого ультразвуку для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) ([Таблиця 4](#)).

- Час зсуву було скориговано для максимального збільшення показника MEDIAN_EXON_COVERAGE, описаного в розділі [Контроль якості на стор. 87](#). Час зсуву (див. [Таблиця 4](#)) та результати MEDIAN_INSERT_SIZE відрізняються в різних конфігураціях.
- Конфігурації 1–4 та 6 було протестовано за допомогою 8-смугових скляних пробірок. У конфігурації 5 використовується одна скляна пробірка. Об'ємна ємність пробірок показана в [Таблиця 4](#).
- Оптимізація конфігурацій 3–6 (менші об'єми водяної бані) з використанням імпульсного режиму.
- Конфігурації 3–5 збільшувалися в пробірках із меншим об'ємом. Об'ємна ємність пробірки впливає на параметри зсуву.
- Конфігурація 4 (лінійний перетворювач, середній об'єм водяної бані, дегазована вода) вимагала тривалого часу затримки імпульсу (40 секунд) для досягнення аналогічного MEDIAN_EXON_COVERAGE як конфігурації 1 і 2 на номінальному вході 40 нг.
- Оптимальні налаштування для конфігурації 3 призвели до дещо більшого розподілу фрагментів за розміром у порівнянні з іншими конфігураціями (MEDIAN_INSERT_SIZE була приблизно на 5–10 пар основ більшою).
- У конфігураціях 3 і 5 використовувалася недегазована вода та найменший об'єм водяної бані.
- Конфігурації 3 і 5 потребували збільшення вводу ДНК (50 нг для конфігурації 3, 60 нг для конфігурації 5) для досягнення аналогічного MEDIAN_EXON_COVERAGE порівняно з іншими 4 конфігураціями, в яких використовували номінальний ввід 40 нг.
- Конфігурації 3 і 5 мають більше пошкоджень і/або денатурації і, отже, знижену ефективну масу молекул dsDNA, які можна використовувати для підготовки бібліотеки.

Центрифугуйте пробірки зі зсувом під час процесу відновлення, щоб переконатися, що вказаний об'єм отримано, оскільки будь-яка втрата матеріалу може негативно вплинути на ефективність роботи приладу.

Таблиця 4 Оцінені цільові конфігурації ультразвукового обладнання

Параметр	Конфігурація					
	1	2	3	4	5	6
Насадка	Лінія	Точка	Точка	Лінія	Точка	Лінія
Об'єм водяної бані	5 л	5 л	85 мл	500 мл	16 мл	1,7 л
Вода дегазована	Так	Так	Ні	Так	Ні	Так
Холодильник для води	Так	Так	Так	Так	Так	Так
Температура водяної бані	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Максимальна падаюча потужність (PIR)	450 Вт	175 Вт	50 Вт	350 Вт	50 Вт	450 Вт
% коефіцієнта заповнення	30	10	30	25	20	25
Циклів на серію	200	200	1000	1000	1000	600
Імпульсний режим (10-секундні імпульси)	Ні	Ні	Так	Так	Так	Так
Час затримки імпульсів	Н/Д	Н/Д	10 с	40 с	10 с	10 с
Час зсуву	250 с	280 с	200 с ¹	320 с ²	200 с ¹	320 с ²
Обробка зразків	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Розмір партії	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Розмір зразка скляної 8-смугової пробірки	130 мкл	130 мкл	50 мкл	50 мкл	Одна пробірка (50 мкл)	130 мкл (або 96-лунковий планшет microTUBE)
Зневоднення	Н/Д	Н/Д	Н/Д	3 мм Y @ 20 мм/с	Н/Д	1,5 мм Y @ 10 мм/с
Еквівалент вводу ДНК (для медіани охоплення екзонів)	40 нг	40 нг	50 нг	40 нг	60 нг	40 нг

¹ Час зсуву 200 секунд складається з 10-секундних імпульсів з 20 повтореннями.² Час зсуву 320 секунд складається з 10-секундних імпульсів з 32 повтореннями.

Швидкість нарощування/зменшення температури термоциклера

Швидкість нарощування/зменшення температури термоциклера впливає на показники контролю якості аналізу (для центрів MSI, для медіани кількості контейнерів CNV Target, медіанного розміру вставки (PHK)) та підтверджуючих зчитувань для варіантів сплайсингу та злиття. Рекомендується оптимізація швидкості нарощування/зменшення температури термоциклера. Наприклад, протестована модель була відрегульована від швидкості нарощування/зменшення за замовчуванням (і максимальної) 5°C/с до 3°C/с, щоб отримати результати, порівняні з результатами інших моделей із нижчою швидкістю нарощування/зменшення за замовчуванням.

Узяття, транспортування та зберігання зразків

Під час взяття, транспортування, зберігання та обробки зразків дотримуйтеся стандартних процедур.

Вимоги до зразків

Тканина FFPE

Для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) потрібно 40 нг РНК та/або 40 нг ДНК, виділеної з тканини FFPE. Використання РНК і ДНК дозволяє аналізувати всі заявлені типи варіантів. Тканину слід зафіксувати за допомогою формалінового фіксатора, що підходить для молекулярних аналізів (наприклад, 10 % нейтрального забуференого формаліну). Тканину не можна декальцинувати. Перед проведенням аналізу TSO Comprehensive (ЄС) патологоанатом повинен оглянути зразок тканини, щоб переконатися, що він підходить для цього аналізу. Для виявлення мутацій соматичних драйверів необхідно щонайменше 20 % вмісту пухлини (за площею). Надійне визначення статусу MSI для різних зразків вимагає щонайменше 30 % вмісту пухлини. Якщо аналіз зразка проводиться з вмістом пухлини менше 30 % для визначення результатів для інших типів варіантів, показник MS-Stable може бути недостовірним. Результат MSI-High є правильним незалежно від вмісту пухлини.

Вміст пухлини для ампліфікації генів і варіантів РНК залежить від ступеня ампліфікації або експресії злиття (див. розділ [Вміст пухлини на стор. 114](#)).

Для високої ймовірності екстракції 40 нг РНК і 40 нг ДНК з різних типів солідних тканин рекомендований об'єм тканини становить $\geq 1,0 \text{ мм}^3$. Цей об'єм еквівалентний сукупній площі життєздатної тканини $\geq 200 \text{ мм}^2$ при використанні зрізів товщиною 5 мкм або $\geq 100 \text{ мм}^2$ при використанні зрізів товщиною 10 мкм. Сукупна площа тканини — це сума життєздатної площі тканини в усіх зрізах, що подаються для екстракції. Наприклад, сукупна площа тканини 200 мм^2 може бути отримана шляхом екстрагування чотирьох зрізів розміром 5 мкм з площею тканини 50 мм^2 кожний або п'яти зрізів розміром 10 мкм з площею тканини 20 мм^2 кожний. Некроз тканин може зменшити вихід нуклеїнової кислоти. Щоб мінімізувати можливість хибнонегативних результатів, тканину можна макродисектувати для досягнення бажаного життєздатного вмісту пухлини.

Висока кількість некротичної тканини (≥ 23 % за площею) може впливати на здатність аналізу TSO Comprehensive (ЄС) виявляти ампліфікації генів і злиття РНК. Якщо зрізи зразка містять більше 23 % некрозу в усій ділянці тканини, некротична тканина повинна бути макродисектована. Якщо в лабораторії виконується аналіз РНК, слід уникати або мінімізувати отримання зрізів із блоку тканини. Див. розділ [Інтерферентні речовини на стор. 104](#).

Тканина FFPE, закріплена на слайді, може зберігатися до 28 днів за кімнатної температури.

Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот

- Виділіть РНК і ДНК зі зразків тканини FFPE за допомогою доступних у продажу наборів для екстрагування. Відмінності в наборах для екстрагування можуть вплинути на ефективність роботи. Див. розділ [Оцінка набору для екстрагування нуклеїнових кислот на стор. 102](#).
- Не збільшуйте рівень протеїнази К або еквівалентного ферменту під час екстракції зі стандартної концентрації, наданої в наборі для екстрагування. Див. розділ [Інтерферентні речовини на стор. 104](#).
- Зберігайте виділену базову нуклеїнову кислоту відповідно до інструкцій виробника набору для екстрагування.
- Зберігайте виділену ДНК до 28 днів за температури від -25 °C до -15 °C.
- Зберігайте виділену РНК до 28 днів за температури від -85 °C до -65 °C.
- Щоб уникнути змін концентрації з часом, виміряйте ДНК і РНК протягом 28 днів після початку підготовки бібліотеки. Визначте кількість РНК і ДНК із використанням флюорометричного методу кількісного визначення, у якому використовуються барвники, що зв'язують нуклеїнову кислоту. Концентрація нуклеїнової кислоти повинна бути середнім значенням принаймні трьох вимірювань.
- Для аналізу потрібно 40 нг кожного зразка РНК, підготованого в воді без-вмісту ДНКази/РНКази (не надається), з кінцевим об'ємом 8,5 мкл (4,7 нг/мкл).
- Для аналізу потрібно 40 нг кожного зразка гДНК з мінімальною концентрацією екстракції 3,33 нг/мкл. Для зсуву потрібен кінцевий об'єм 52 мкл (0,77 нг/мкл) з мінімум 40 мкл ТЕВ (надається), що використовується як розчинник.

Зберігання бібліотеки

Зберігайте бібліотеки в планшетах для ПЛР із низьким зв'язуванням протягом 7–32 днів, залежно від типу бібліотеки (див. [Таблиця 5](#)).

Таблиця 5 Строки зберігання бібліотеки

Тип бібліотеки	Планшет	Кількість днів	Температура зберігання
кДНК	ПЛР PCF	≤ 7	Від -25 °C до -15 °C
Фрагментована гДНК	ПЛР LP	≤ 7	Від -25 °C до -15 °C
Попереднє збагачення	ПЛР ALS	≤ 30	Від -25 °C до -15 °C
Після збагачення	ПЛР ELU2	≤ 7	Від -25 °C до -15 °C
ПЛР після збагачення	ПЛР PL	≤ 30	Від -25 °C до -15 °C
Нормалізований	ПЛР NL	≤ 32	Від -25 °C до -15 °C

Застереження

Безпека



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Цей набір реагентів містить потенційно небезпечні хімічні речовини. Вдихання, проковтування, потрапляння на шкіру та в очі може завдати шкоди здоров'ю. Вентиляція має відповідати стандартам роботи з небезпечними матеріалами в реагентах. Надягайте захисне приладдя, зокрема засоби захисту очей, рукавички та лабораторний одяг, з урахуванням ризику впливу. Поводьтеся з використаними реагентами як із хімічними відходами й утилізуйте їх відповідно до застосовних регіональних, державних і місцевих законів та нормативних правил. Щоб отримати додаткову інформацію про захист навколишнього середовища, здоров'я та безпеку, див. SDS (Паспорт безпеки продукції) на сторінці support.illumina.com/sds.html.

- Поводьтеся з усіма зразками так, ніби вони заразні.
- Використовуйте стандартні заходи застереження, прийняті в лабораторії. Не використовуйте піпетування ротом. Не вживайте їжу або напої й не палить у робочих зонах. Під час роботи зі зразками та реагентами для аналізу надягайте одноразові рукавички й лабораторний одяг. Після роботи зі зразками та реагентами для аналізу ретельно мийте руки.

Лабораторія

- Щоб запобігти забрудненню, організуйте проведення однонаправленого робочого процесу в лабораторії. Виділіть для зон преампліфікації та постампліфікації спеціальне обладнання (як-от піпетки, наконечники піпеток, вихрову мішалку й центрифугу). Щоб запобігти перенесенню продукту ампліфікації або зонда, не повертайтеся в зону преампліфікації після входу в зону постампліфікації.
- Виконайте кроки Index PCR (Індекс ПЛР) та Enrichment (Збагачення) в зоні постампліфікації, щоб запобігти переміщенню продукту ампліфікації.
- Процедури підготовки бібліотеки вимагають середовища без РНКаз/ДНКаз. Ретельно дезінфікуйте робочі місця очисним засобом, що пригнічує РНКазу/ДНКазу. Використовуйте сертифікований пластик, який не містить ДНКаз, РНКаз та геномної ДНК людини.
- Для процедур після ампліфікації ретельно очищуйте робочі поверхні та обладнання до та після кожної процедури за допомогою свіжоприготованого 0,5 % розчину гіпохлориту натрію (NaOCl). Залиште розчин контактувати з поверхнями протягом 10 хвилин, а потім ретельно протріть його 70 % етиловим або ізопропіловим спиртом.
- Використовуйте мікроцентрифужні пробірки, планшети, наконечники піпеток і резервуари без нуклеаз.

- Використовуйте каліброване обладнання протягом усього аналізу. Переконайтеся, що обладнання калібрується до швидкостей, температур та об'ємів, зазначених у цьому протоколі.
- Використовуйте прецизійні піпетки для забезпечення точної подачі реагенту та зразка. Регулярно калібруйте їх відповідно до специфікацій виробника.
- Під час використання багатоканальних піпеток дотримуйтеся наступних вказівок:
 - Піпеткою додайте щонайменше ≥ 2 мкл.
 - Переконайтеся, що бар'єрні наконечники добре встановлені та підходять до бренду й моделі багатоканальних піпеток.
 - Прикріплюйте наконечники перекочувальними рухами, щоб переконатися, що всі наконечники однаково добре прикріплені.
 - Аспіруйте під кутом 90° з однаковими рівнями об'єму рідини по всіх наконечниках.
 - Після доставки ретельно перемішайте всі компоненти, багаторазово набираючи та випускаючи реакційну суміш піпеткою.
 - Після дозування переконайтеся, що рідина повністю витекла з кожного наконечника.
- Обов'язково використовуйте обладнання, вказане для аналізу, та встановіть програми відповідно до вказівок.
- Указані температури для термоциклера й інкубатора з мікроразками вказують на температуру реакції, а не обов'язково на задану температуру обладнання.

Аналіз

- Уникайте перехресного забруднення.
 - Під час роботи зі зразками та реагентами дотримуйтеся належних лабораторних правил.
 - Використовуйте свіжі витратні лабораторні матеріали та свіжі наконечники піпеток для кожного зразка та для дозування різних продуктів.
 - Використовуйте стійкі до аерозолів наконечники, щоб знизити ризик перехресного забруднення.
 - Використовуйте односпрямований робочий процес під час переходу від попередньої ампліфікації до областей після ампліфікації.
 - Працюйте та відкривайте лише один індексний праймер за раз. Відразу після використання закрийте кришкою кожну індексну пробірку. Додаткові кришки постачаються в комплекті.
 - Часто змінюйте рукавички, якщо вони контактують з індексними праймерами або зразками.
 - Прибирайте невикористані пробірки з індексними праймерами з робочої зони.
 - Не повертайте реагенти в пробірки для зберігання після використання зі смужкою для пробірок, жолобом або резервуаром.
 - Змішуйте зразки за допомогою піпетки та центрифугуйте планшет, коли вказано.
 - Використовуйте шейкер для мікропланшетів. Не струшуйте чашки.

- Не замінюйте компоненти аналізу на компоненти з інших партій наборів реагентів. На етикетці коробки з реагентами та аркуші основної партії вказані партії наборів реагентів.
- Належні правила поводження в лабораторії є обов'язковими для попередження забруднення реагентів, приладів та інструментів, а також геномних зразків ДНК продуктами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Забруднення нуклеазою та продуктами ПЛР може призвести до неправильних і ненадійних результатів.
- Для оптимальної ефективності та зберігання аналізу потрібен відповідний тип планшета. Обов'язково дотримуйтесь інструкцій з перенесення планшета, наведених в розділі [Інструкції з використання на стор. 41](#).
- Недотримання викладених процедур може призвести до неправильних результатів або значного погіршення якості бібліотеки.
- Якщо момент зупинення не зазначено в [Інструкції з використання на стор. 41](#), відразу переходьте до наступного етапу.
- Зберігайте реагенти або компоненти аналізу за визначеної температури в призначених зонах преампліфікації та постампліфікації.
- Не зберігайте реагенти в неморозильних відділеннях або у дверцятах холодильника.
- Не заморожуйте реагенти, що містять частки (LNB1, SPB і SMB).
- Не використовуйте реагенти, які зберігалися неналежним чином.
- Не відхиляйтеся від процедур змішування та обробки, вказаних для кожного реагенту. Неналежне перемішування або надмірне вортексування реагентів може призвести до отримання неточних результатів проби.
- FSM, SSM, ERA1-B і TCB1 можуть мати частинки, пов'язані з препаратом. Дотримуйтесь інструкцій щодо поводження з кожним конкретним реагентом. Після виконання етапів змішування FSM і SSM залишки білих частинок, пов'язаних із продуктом, не вплинуть на продуктивність.
- Готуйте свіжі основні суміші та викидайте залишковий об'єм після використання.
- Для етапів промивання завжди готуйте свіжий 80% етанол з водою без вмісту РНКаз/ДНКаз. Етанол може поглинати воду з повітря, що може вплинути на результати. Утилізуйте 80% етанол після використання відповідно до місцевих, регіональних та/або федеральних норм.
- Перенесіть зазначений об'єм елюату. Перенесення елюату в кількості, меншій за вказаний об'єм під час етапів вимивання, може вплинути на результати.
- Використовуйте наведені нижче інструкції для ультразвукових апаратів. Обов'язково дотримуйтесь інструкцій виробника.
 - Повільно завантажте гДНК в ультразвукову пробірку, щоб уникнути утворення бульбашок. Надмірні бульбашки або повітряний проміжок у трубці зсуву можуть призвести до неповної фрагментації.
 - Повільно розподіляйте вміст в ультразвуковій пробірці та уникайте розбризкування.

- Щоб уникнути витіснення рідини та втрати зразка, не вставляйте наконечник піпетки на дно ультразвукової пробірки під час виймання фрагментованої ДНК.
- Не піпетуйте менш ніж 2 мкл вхідної проби.
- Не використовуйте ємність для розподілу реагентів для етапів, які потребують додавання матеріалу менше 10 мкл в кожну лунку для зразка.
- Для перенесення фрагментованих зразків гДНК з ультразвукових пробірок до планшета для підготовки бібліотеки (LP) використовуйте піпетку з тонким наконечником.
- Не об'єднуйте разом адаптери SUA1 і UMI.
- Використовуйте адаптери SUA1 зі зразками РНК.
- Використовуйте адаптери UMI зі зразками ДНК.
- Призначте для кожного зразка бібліотеки різні індексні праймери, щоб ідентифікувати унікальну кожну бібліотеку, коли її об'єднують для секвенування на одній проточній кюветі.
- Не поєднуйте праймери з індексами CPxx та UPxx в одній бібліотеці.
- Невідповідність між зразком і та індексними праймерами завадить виявленню позитивного зразка та призведе до отримання хибного результату. Введіть ідентифікатори зразків і призначте індекси в Модуль аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EC) перед початком підготовки бібліотеки. Запишіть ідентифікатори проби, індексацію та орієнтацію лунки планшета для довідки під час підготовки бібліотеки.
- Для бібліотек, отриманих зі зразків РНК, використовуйте лише індекси UPxx.
- Для бібліотек, отриманих зі зразків ДНК, використовуйте індекси UPxx або індекси CPxx.
- Секвенуйте максимум 8 бібліотек РНК і 8 бібліотек ДНК на проточну кювету. Секвенуйте щонайменше три бібліотеки. Дотримуйтеся інструкцій розділу [Кількість бібліотек та вибір індексів на стор. 37](#).
- Після етапу зв'язування з розділу [Захоплення цілі один на стор. 65](#) і [Захоплення цілі два на стор. 69](#) негайно перейдіть до етапу промивання, щоб запобігти висиханню гранул.
- Під час етапів промивання видаліть увесь вміст 80% етанолу з дна лунок. Було показано, що залишковий етанол впливає на результати.
- Для оптимальної ефективності аналізу дотримуйтеся вказаної кількості циклів промивання, зазначених в [Інструкції з використання на стор. 41](#).
- Під час процедури з розділу [Нормалізація бібліотеки на стор. 76](#) ретельно ресуспендуйте гранули бібліотечних часток, щоб досягти рівномірної щільності кластера на проточній кюветі.
- Негайно повідомляйте про всі серйозні інциденти, пов'язані з цим виробом, у компанію Illumina й компетентні установи держав, у яких перебувають користувач і пацієнт.

Зауваження до процедур

- Робочий процес TSO Comprehensive (ЄС) можна проводити за таким графіком:
 - День 1: синтез кДНК зі зразків РНК, фрагментація ДНК зразків гДНК, підготовка бібліотеки та початок гібридизації протягом ночі (перша).
 - День 2: збагачення, нормалізація збагачених бібліотек і завантаження бібліотек у секвенатор NextSeq 550Dx.Якщо виконати робочий процес TSO Comprehensive (ЄС) згідно з цим графіком неможливо, у всьому протоколі зазначено кілька точок безпечного зупинення. Якщо точку не зазначено, відразу переходьте до наступного етапу.
- Бібліотеки, отримані зі зразків РНК і ДНК, можна готувати одночасно в окремих лунках.
- Таблиці приготування основної суміші включають перевищення об'єму, щоб забезпечити достатній об'єм для кількості зразків, що обробляються.
- Використовуйте надчисту воду без нуклеаз.
- Після додавання реагенту промийте наконечник, одноразово аспіруючи та видаляючи його у відповідну лунку в планшеті, якщо інше не зазначено в процедурі.
- Кімнатною температурою вважається температура від 15 °С до 30 °С.
- Реагенти, зразки та бібліотеки повинні зберігатися в холоді на певних етапах, зазначених в інструкціях із застосування. Це визначається як зберігання на льоду або його еквіваленті.

Програми термоциклера

- Перед початком протоколу запрограмуйте програми термоциклера на обладнанні для попередньої та подальшої ампліфікації.
- Переконайтеся, що планшети для ПЛР щільно прилягають до термоциклера.
- Використовуйте планшети, рекомендовані виробником термоциклера.

Закриття й відкриття планшета

- Завжди герметично запечатуйте планшети за допомогою нового ущільнювача. Не використовуйте повторно ущільнювачі.
- Щоб запечатати планшет, надійно прикріпіть клейку кришку до планшета за допомогою герметичного клину або валика.
- Завжди герметично закривайте 96-лунковий планшет новою клейкою пломбою, перш ніж виконувати вказані далі етапи протоколу.
 - Етапи струшування планшетів
 - Етапи центрифугування
 - Етапи термічного циклування

- Гібридизації
- Довгострокове зберігання
- Переконайтеся, що краї та лунки герметично закриті, щоб зменшити ризик перехресного забруднення та випаровування.
- Перш ніж відкрити планшет, розмістіть його на рівній поверхні.
- Якщо перед розпакуванням на герметичному ущільненні або бічних стінках лунок планшета спостерігається рідина або конденсат, центрифугуйте на 280 g протягом 1 хвилини.
- Використовуйте клейкі герметики для планшетів, ефективні за температури від -20°C до 100°C та придатні для ПЛР-планшетів з бортиками або напівбортиками.

Обладнання

- Перед початком аналізу переконайтеся, що персонал лабораторії ознайомився з інструкціями виробника щодо експлуатації та технічного обслуговування всього обладнання.

Тип планшету та перенесення планшету

- Для оптимальної ефективності та зберігання аналізу потрібен відповідний тип планшета.
- При перенесенні об'ємів між планшетами перенесіть вказаний об'єм з кожної лунки планшета у відповідну лунку планшета призначення.
- Багатоканальні піпетки можна використовувати для перенесення зразків між смужками пробірок або планшетами.
- Під час струшування чашок дотримуйтеся наведених нижче вказівок.
 - Для струшування планшетів використовуйте шейкер. Не струшуйте планшети.
 - Струшуйте планшети для ПЛР на 1200 об./хв.
 - Струшуйте планшети MIDI на 1800 об./хв.
 - Дотримуйтеся інструкцій виробника, щоб переконатися, що струшувач планшета надійно утримує планшет.

Центрифугування

- Якщо у протоколі вказано, що необхідно центрифугувати протягом короткого часу, центрифугуйте на 280 g протягом 1 хвилини.
- Якщо рідина спостерігається на ущільнювачі або з боків лунки, центрифугуйте планшет на 280 g протягом 1 хвилини.

Поводження з реагентами

- Щільно закрийте всі пробірки з реагентами відразу після використання, щоб обмежити випаровування та запобігти забрудненню.

- Поверніть реагенти до вказаної температури зберігання, коли вони більше не будуть потрібні для процедури.
- Дотримуйтеся підготовки реагенту, яка передує кожному розділу процедури в [Інструкції з використання на стор. 41](#).
- Обов'язково підготуйте необхідний об'єм основної суміші, суміші для елювання та 80 % етанолу для кількості зразків, які ви обробляєте.
- Об'єми, надані в основній суміші та таблицях з розчином, містять надлишковий об'єм. Обчислення об'єму перевищення розмірів наведені нижче.
 - [Таблиця 14](#)
 - Об'єм FSM = (7,2 мкл) x (кількість зразків + контролю) x (1,25).
 - Об'єм RVT = (0,8 мкл) x (кількість зразків + контролю) x (1,25).
 - [Таблиця 21](#)
 - Об'єм ERA1-B = (7,2 мкл) x (кількість бібліотек) x (1,20).
 - Об'єм ERA1-A = (2,8 мкл) x (кількість бібліотек) x (1,20).
 - [Таблиця 29](#)
 - Об'єм EE2 = (20,9 мкл) x (кількість бібліотек) x (1,364).
 - Об'єм HP3 = (1,1 мкл) x (кількість бібліотек) x (1,364).
 - [Таблиця 30](#)
 - Об'єм EE2 = (20,9 мкл) x (кількість бібліотек) x (1,364).
 - Об'єм HP3 = (1,1 мкл) x (кількість бібліотек) x (1,364).
 - [Таблиця 36](#)
 - Об'єм LNA1 = (38,1 мкл) x (кількість бібліотек) x (2,0).
 - Об'єм LNB1 = (6,9 мкл) x (кількість бібліотек) x (2,0).
 - [Таблиця 37](#)
 - Об'єм EE2 = (30,4 мкл) x (кількість бібліотек) x (1,25).
 - Об'єм HP3 = (1,6 мкл) x (кількість бібліотек) x (1,25).

Комплекти адаптерів

- Аналіз TSO Comprehensive (ЄС) включає адаптери SUA1 та UMI.
- Адаптери SUA1 призначені для використання зі зразками РНК. Не для використання зі зразками ДНК.
- Адаптери UMI призначені для використання зі зразками ДНК. Не для використання зі зразками РНК.

Обробка гранул

- До аналізу TSO Comprehensive (ЄС) включено три типи гранул (SPB, SMB і LNB1). Переконайтеся, що під час процедури використовується правильний тип гранул.

- Виконайте правильну кількість циклів промивання для кожного типу гранул.
- Перед використанням переконайтеся, що гранули мають кімнатну температуру.
- Перед використанням перемішайте гранули за 1 хвилину, щоб забезпечити однорідність.
- Під час змішування гарнул за допомогою піпетки дотримуйтеся наведених нижче вказівок.
 - Використовуйте відповідний розмір піпетки та наконечника для об'єму, який ви змішуєте.
 - Відрегулюйте налаштування об'єму до приблизно 50–75 % від об'єму проби.
 - Піпеткою повільно натискайте, не відпускаючи поршень.
 - Уникайте розбризкування та потрапляння бульбашок.
 - Помістіть наконечник піпетки над осадом і відпустіть його безпосередньо в осад, щоб вивільнити частки з лунки або пробірки.
 - Переконайтеся, що гранула повністю міститься в розчині. Розчин повинен виглядати темно-коричневим і мати однорідну консистенцію.
 - Перевірте наявність гранули. Обережно аспіруйте загальний розчин гранул у наконечнику та подивіться на дно лунок.
- Якщо гранули аспіруються в наконечники піпеток під час етапів магнітного розділення, видайте гранули назад у лунку планшета на магнітній стійці. Зачекайте, доки рідина не стане прозорою (приблизно 2 хвилини), перш ніж переходити до наступного етапу процедури.
- Під час промивання гранул:
 - Використовуйте рекомендовану магнітну підставку для планшета.
 - Нанесіть рідину безпосередньо на гранулу так, щоб частки на боковій поверхні лунок були змочені.
 - Тримайте планшет на магнітній підставці, доки процедура не вкаже на її видалення.
 - Не збовтуйте планшет під час перебування на магнітній стійці.
 - Перебуваючи на магнітній стійці, не порушуйте гранулу.
- Під час промивання гранул або видалення надосадової рідини тримайте наконечники піпеток під кутом у нижній частині лунок, щоб уникнути утворення вакууму та натягування розчину в фільтри наконечників піпеток.

Кількість бібліотек та вибір індексів

Перш ніж запустити налаштування, сплануйте кількість бібліотек зразків та індексів зразків для прогону секвенування. Наведені нижче рекомендації щодо кількості зразків включають позитивні контролю, але не включають негативні/безматричні контролю (NTC). У запланований пробіг необхідно додати NTC як додатковий зразок.

Для TSO Comprehensive (ЄС), дотримуйтеся вказівок які наводять [Таблиця 6](#) і [Таблиця 7](#), щоб визначити кількість бібліотек РНК та/або ДНК для послідовності на одній проточній кюветі. [Таблиця 6](#) — якщо ви секвенуєте бібліотеки РНК або ДНК окремо. [Таблиця 7](#) — якщо ви секвенуєте бібліотеки РНК і ДНК на тій самій проточній кюветі.

Таблиця 6 Бібліотеки секвенування РНК або ДНК

Тип бібліотеки	Мінімум*	Максимум*
Тільки РНК	3	16
Тільки ДНК	3	8

* NTC не впливають на плексність.

Таблиця 7 Бібліотеки секвенування РНК і ДНК на одній проточній кюветі

Тип бібліотеки	Мінімум*	Максимум*
РНК	3	8
ДНК	3	8

* NTC не впливають на плексність.

Для оптимального використання реагенту при секвенуванні бібліотек ДНК і РНК з TSO Comprehensive (ЄС) на секвенаторі NextSeq 550Dx, секвенуйте 8 бібліотек РНК і 8 бібліотек ДНК на проточну кювету.

Індексні праймери унікально ідентифікують кожний зразок, щоб бібліотеки можна було об'єднати для секвенування на одній проточній кюветі. Під час налаштування прогону через Модуль аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) на екрані Create Run (Створити прогін) відображаються сумісні комбінації індексів. Під час підготовки бібліотеки додайте індексний праймер до кожної бібліотеки зразків. *Для кожної бібліотеки зразків використовуйте іншу суміш індексних праймерів.*

Переконайтеся, що індексні праймери, які ви використовуєте зі зразками, відповідають індексам, вибраним для аналізу через Модуль аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС). *Неправильні методи призводять до неправильної звітності про результати через втрату позитивної ідентифікації зразка.*

В аналізі TSO Comprehensive (ЄС) є два типи індексів.

- **UPxx indexes** (Індекси UPxx) — використовуйте індекси UPxx для бібліотек, отриманих зі зразків РНК або ДНК.
- **CPxx indexes** (Індекси CPxx) — використовуйте індекси CPxx для бібліотек, отриманих зі зразків ДНК. Не використовуйте індекси CPxx для бібліотек, отриманих із РНК, або якщо секвенування включає лише три бібліотеки ДНК загалом.

Під час секвенування лише трьох бібліотек застосовуються такі вимоги:

- Бібліотеки повинні являти собою всі ДНК або всі РНК.
- Не використовуйте набори індексів CPxx.
- Один із таких наборів індексів UPxx необхідний для забезпечення достатньої різноманітності:
 - UP01, UP02 та UP03
 - UP04, UP05 та UP06
 - UP07, UP08 і UP09
 - UP10, UP11 і UP12

Наприклад, першій бібліотеці призначено UP01, другій бібліотеці UP02 і третій бібліотеці UP03.

Набір контролів TruSight Oncology Controls

Для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) потрібен набір контрольних зразків TruSight Oncology Controls, що складається з наборів ДНК-контролю TruSight Oncology та наборів РНК-контролю TruSight Oncology як позитивних контролів. Включайте ДНК-контролі TruSight Oncology для кожної серії секвенування ДНК та РНК-контролі TruSight Oncology для кожної серії секвенування РНК у задану подію підготовки бібліотеки (в тому числі також контролі для об'єднаних циклів ДНК та РНК). Для кожного запланованого циклу секвенування готують унікальний позитивний контроль. Для отримання додаткової інформації див. Листок-вкладиш до TruSight Oncology Controls (документ № 200009919).

Вхідна кількість позитивного контролю становить 40 нг для ДНК і РНК.

Додайте відповідний NTC до кожної РНК та кожної події підготовки бібліотеки ДНК. NTC кілька разів секвенується в одній події підготовки бібліотеки. Використовуючи контролі TruSight Oncology Controls, дотримуйтеся таких вказівок:

- Підготуйте бібліотеки з позитивних контролів і контролів без матриці так само, як і зразки.
- Використовуйте ТЕВ для ДНК NTC.
- Для аналізу РНК NTC використовуйте воду без ДНКази/РНКази.
- Позитивні контролі включені до максимальних вимог до бібліотеки.
- NTC не включаються до мінімальних вимог до бібліотеки.
- Використовуйте індекси UP для NTC лише під час секвенування 3 бібліотек.
- Оскільки NTC кілька разів секвенується, індекси, вибрані для цього контролю, не можна повторювати в події підготовки бібліотеки.

У таблицях нижче наведено приклади макетів планшетів для підготовки бібліотеки. Кожен пронумерований стовпчик являє собою один прогін секвенування. Під час секвенування бібліотек ДНК і РНК кожний відповідний набір стовпців являє собою один прогін секвенування (наприклад, стовпець 1 і стовпець 7). NTC секвенується для кожного стовпця або набору стовпців.

Таблиця 8 Подія підготовки бібліотеки одного прогону, включаючи шість зразків пацієнта

	1	2	3	4	5	6	7
A	Контроль ДНК позит	порожній	порожній	порожній	порожній	порожній	Контроль РНК позит
B	ДНК 1	порожній	порожній	порожній	порожній	порожній	РНК 1
C	ДНК 2	порожній	порожній	порожній	порожній	порожній	РНК 2
D	ДНК 3	порожній	порожній	порожній	порожній	порожній	РНК 3
E	ДНК 4	порожній	порожній	порожній	порожній	порожній	РНК 4
F	ДНК 5	порожній	порожній	порожній	порожній	порожній	РНК 5
G	ДНК 6	порожній	порожній	порожній	порожній	порожній	РНК 6
H	ДНК NTC	порожній	порожній	порожній	порожній	порожній	РНК NTC

Таблиця 9 Подія підготовки бібліотеки трьох прогонів, включаючи 20 зразків пацієнтів

	1	2	3	4	5	6	7
A	Контроль ДНК позит	Контроль ДНК позит	Контроль ДНК позит	порожній	Контроль РНК позит	Контроль РНК позит	Контроль РНК позит
B	ДНК 1	ДНК 7	ДНК 14	порожній	РНК 1	РНК 7	РНК 14
C	ДНК 2	ДНК 8	ДНК 15	порожній	РНК 2	РНК 8	РНК 15
D	ДНК 3	ДНК 9	ДНК 16	порожній	РНК 3	РНК 9	РНК 16
E	ДНК 4	ДНК 10	ДНК 17	порожній	РНК 4	РНК 10	РНК 17
F	ДНК 5	ДНК 11	ДНК 18	порожній	РНК 5	РНК 11	РНК 18
G	ДНК 6	ДНК 12	ДНК 19	порожній	РНК 6	РНК 12	РНК 19
H	ДНК NTC	ДНК 13	ДНК 20	порожній	РНК NTC	РНК 13	РНК 20

Інструкції з використання

Огляд робочого процесу TSO Comprehensive (ЄС) демонструють [Малюнок 1](#) і [Малюнок 2](#).

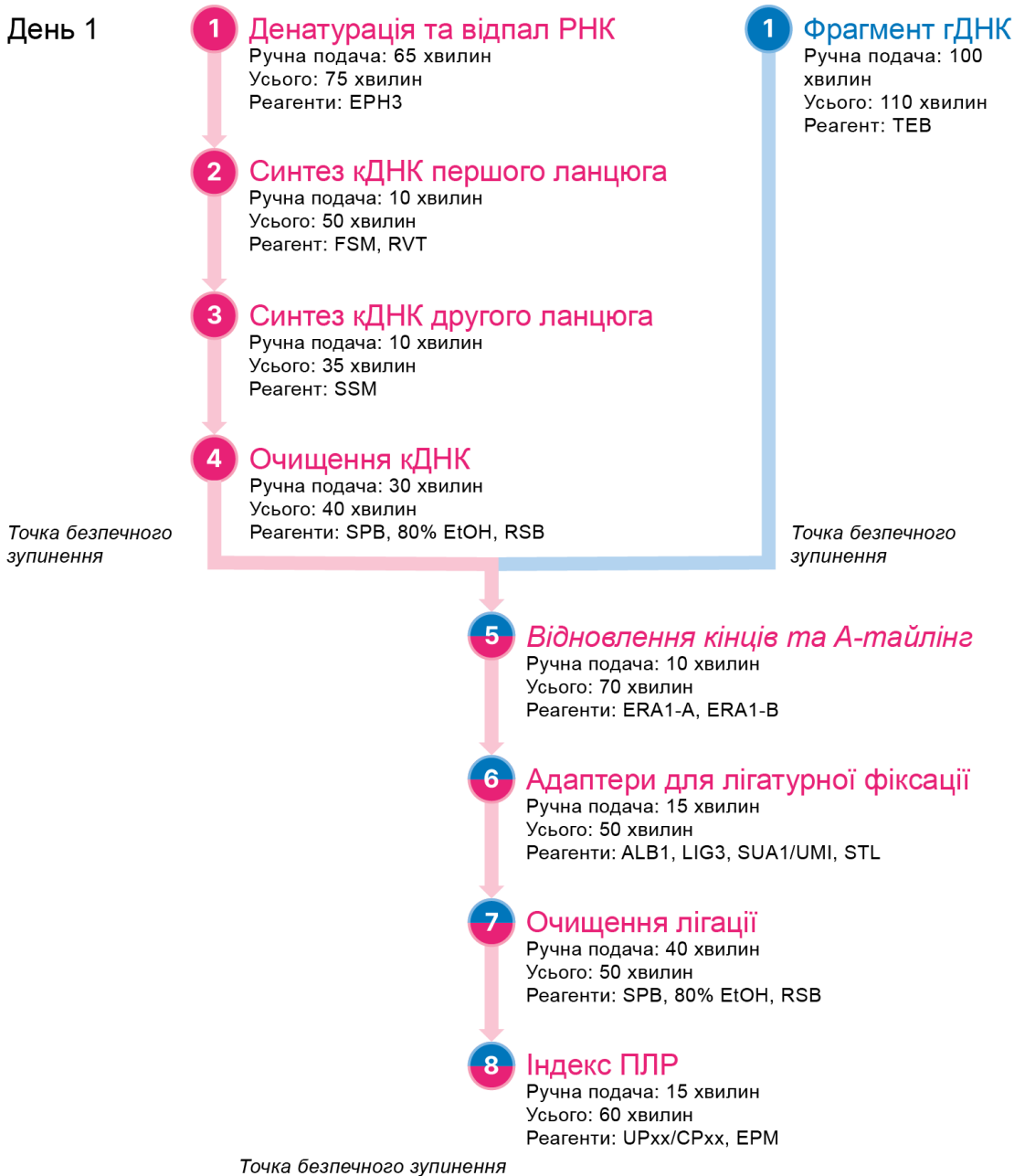
Робочий процес підготовки бібліотеки

[Малюнок 1](#) показує робочий процес підготовки бібліотеки для TSO Comprehensive (ЄС). Бібліотеки зі зразків РНК і ДНК можна готувати одночасно в окремих лунках. Позитивні контролі та контролі без матриці обробляються так само, як і зразки. Точки безпечного зупинення позначаються між етапами.

Перш ніж почати виконання протоколу, введіть інформацію про прогін і зразок в Модуль аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС). Див. *Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (документ № 200008661)*.

Малюнок 1 TSO Comprehensive (ЄС) Робочий процес (частина 1)

День 1



● кДНК

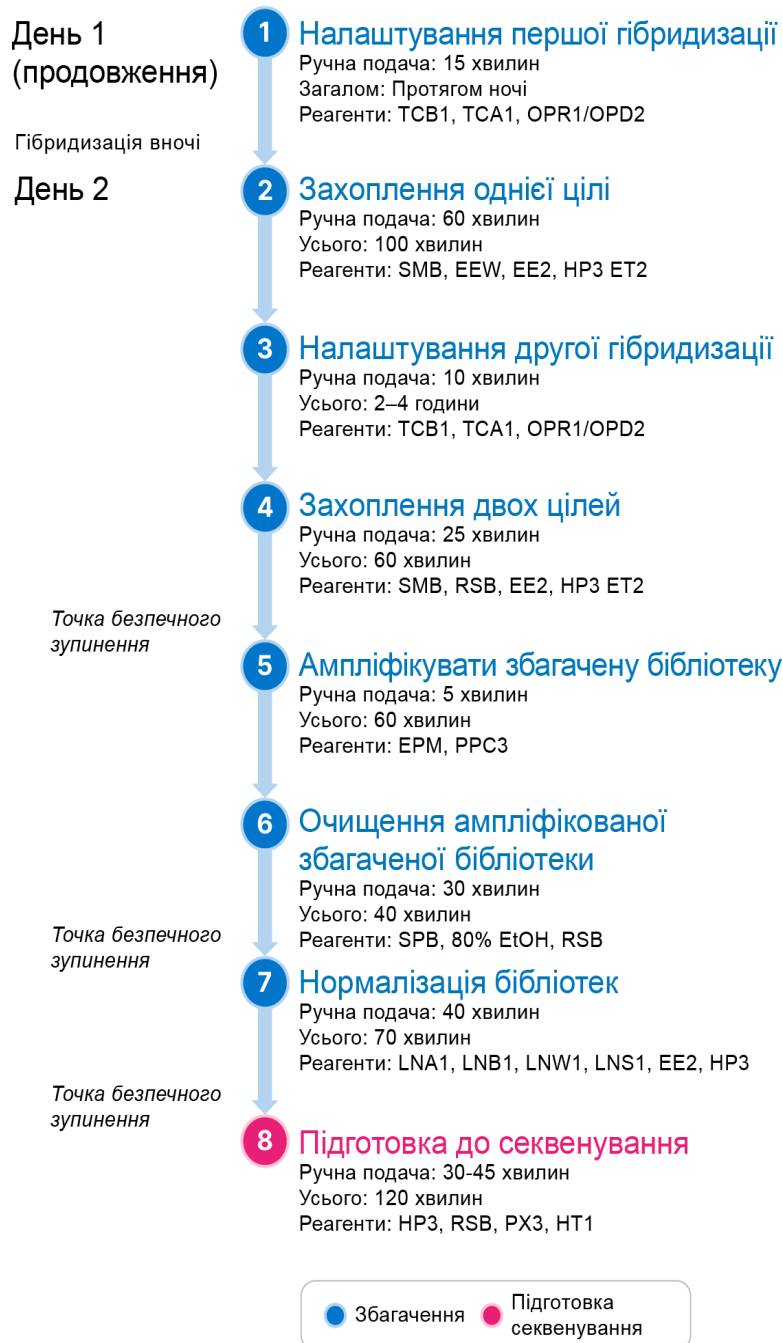
● Зрізана ДНК

*Ручна подача і загальна тривалість є приблизними.

Робочий процес Enrichment (Збагачення)

Малюнок 2 ілюструє робочий процес Enrichment (Збагачення) для TSO Comprehensive (ЄС). Точки безпечного зупинення позначаються між етапами.

Малюнок 2 TSO Comprehensive (ЄС). Робочий процес (частина 2)



Програмування термоциклерів

Перед початком аналізу збережіть наступні програми на термоциклерах для пре- і постампліфікації.

Таблиця 10 Програми термоциклерів для преампліфікації

Етап процедури	Назва програми	Температура кришки	Об'єм реакції	Параметри теплоциклера
Денатурація та відпал РНК	LQ-RNA	100 °C	17 мкл	65 °C протягом 5 хвилин 4 °C протягом 1 хвилини - Залишіть за температури 4 °C
Синтез першого ланцюга кДНК	1stSS	100 °C	25 мкл	25 °C протягом 10 хвилин 42 °C протягом 15 хвилин 70 °C протягом 15 хвилин 4 °C протягом 1 хвилини - Залишіть за температури 4 °C
Синтез другого ланцюга кДНК	2ndSS	30 °C	50 мкл	16 °C протягом 25 хвилин 4 °C протягом 1 хвилини - Залишіть за температури 4 °C

ПРИМІТКА Якщо температуру кришки для 2ndSS не можна встановити на 30 °C, вимкніть функцію нагрівання попередньо нагрітої кришки.

Таблиця 11 Програми теплоциклерів для постампліфікації

Етап процедури	Назва програми	Температура кришки	Об'єм реакції	Параметри теплоциклера
Індекс ПЛР	I-PCR	100 °C	50 мкл	98 °C протягом 30 секунд 15 циклів: 98 °C протягом 10 секунд 60 °C протягом 30 секунд 72 °C протягом 30 секунд 72 °C протягом 5 хвилин - Залишіть за температури 10 °C

Етап процедури	Назва програми	Температура кришки	Об'єм реакції	Параметри теплоциклера
Проведення першої гібридизації	HYB1	100 °C	50 мкл	95 °C протягом 10 хвилин 85 °C протягом 2 хвилин 30 секунд 75 °C протягом 2 хвилин 30 секунд 65 °C протягом 2 хвилин 30 секунд - Залишіть за температури 57 °C протягом 8–24 годин
Проведення другої гібридизації	HYB2	100 °C	50 мкл	95 °C протягом 10 хвилин 85 °C протягом 2 хвилин 30 секунд 75 °C протягом 2 хвилин 30 секунд 65 °C протягом 2 хвилин 30 секунд - Залишіть за температури 57 °C протягом 1,5–4 годин
Ампліфікація збагаченої бібліотеки	EL-PCR	100 °C	50 мкл	98 °C протягом 30 с 18 циклів: 98 °C протягом 10 с 60 °C протягом 30 с 72 °C протягом 30 с 72 °C протягом 5 хв - Залишіть за температури 10 °C

Підготовка до протоколу

Ця підготовка необхідна для виконання етапів протоколу, які ведуть до наступної точки безпечного зупинення.



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Для всіх процедур робочого процесу потрібне середовище без РНКаз/ДНКаз.

1. Ретельно дезінфікуйте робочі зони за допомогою очисника, що пригнічує РНКазу/ДНКазу.
2. Переконайтеся, що встановлені програми термоциклера попередньої ампліфікації. Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).
3. Дотримуйтесь інструкцій виробника, щоб налаштувати ультразвуковий апарат.

4. Якщо ви обробляєте тільки зразки ДНК, перейдіть безпосередньо до розділу [Фрагментація гДНК на стор. 51](#).
5. Вийміть РНК-контролі із місця зберігання.
6. Вийміть пробірки з реагентами з коробки та дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування.

Таблиця 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (PN 20031127)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
EPH3	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Денатурація та відпал РНК
FSM	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Синтез першого ланцюга кДНК
RVT	Від -25 °C до -15 °C	Підтримуйте холод.	Синтез першого ланцюга кДНК
SSM	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Синтез другого ланцюга кДНК

Таблиця 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (охолодження) (PN 20031119)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
SPB (світло-зелена етикетка)	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури протягом 30 хвилин.	Очищення кДНК
RSB	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Очищення кДНК

Денатурація та відпал РНК

Цей процес денатурує очищену РНК та заповнює її випадковими гексамерами для підготовки до синтезу кДНК.

Підготування

1. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - EPH3 — відкладіть.
 - FSM — змішайте на вихровій мішалці. Нетривалий час відцентрифугуйте, а потім піпеткою перемішайте.
Реагент може містити білі частинки, пов'язані з препаратом. Жодних додаткових дій користувача не потрібно. Вплив на ефективність продукту відсутній.

- RVT — нетривалий час центрифугуйте, а потім піпеткою перемішайте. Підтримуйте холод.

ПРИМІТКА RVT — це в'язкий розчин. Мінімізуйте утворення бульбашок під час піпетування.

- У мікроцентрифужній пробірці об'єднайте наступні об'єми для приготування суміші FSM + RVT Master Mix.

Таблиця 14 FSM + RVT Master Mix*

Компонент Master Mix	4 бібліотеки (мкл)	8 бібліотек (мкл)	16 бібліотек (мкл)	24 бібліотеки (мкл)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* Ця таблиця враховує допустимий надлишок об'єму. Розрахунки див. у розділі [Поводження з реагентами на стор. 35](#).

- За допомогою піпетки перемішайте 10 разів.
- Зберігайте суміш FSM + RVT Master Mix холодною до етапу [Синтез першого ланцюга кДНК на стор. 48](#).

Процедура

- Під час розморожування зразки виділеної РНК і контролі РНК зберігають холодними. Обробіть контролі РНК як зразки для решти протоколу.
- Підтримуйте РНК холодною, коли вона не використовується. Для кількісного визначення зразків див. розділ [Вимоги до зразків на стор. 28](#).
- За допомогою піпетки перенесіть кожен зразок РНК 10 разів, щоб змішати його.
- Використовуйте воду без вмісту РНКаз/ДНКаз для одержання 40 нг кожного зразка РНК в кінцевому об'ємі 8,5 мкл (4,7 нг/мкл).
Для контролю РНК використовуйте концентрацію, вказану на етикетці пробірки.
- Промаркуйте новий 96-лунковий планшет для ПЛР CF (фрагменти кДНК).
- Додайте 8,5 мкл кожного зразка РНК в унікальну лунку планшета для ПЛР CF.
- Переконайтеся, що розташування та індекси планшетів для зразків для кожного зразка відповідають циклу обробки, запланованому через Модуль аналізу TSO Comprehensive (ЄС) під час налаштування прогону.
- Змішайте ЕРНЗ на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
- Додайте 8,5 мкл ЕРНЗ у кожну лунку для зразка.
- Нанесіть ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР CF.



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.

11. Змішайте вихровій мішалці за 1200 об/хв протягом 1 хвилини.
12. Відцентрифугуйте за 280 × g протягом 1 хвилини.
13. Помістіть на термоциклер і запустіть програму LQ-RNA.
Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).
14. Коли зразки досягнуть 4°C, утримуйте протягом 1 хвилини. Негайно переходьте до наступного кроку.

Синтез першого ланцюга кДНК

Цей процес зворотно транскрибує фрагменти РНК, заправлені випадковим чином гексамери в перший ланцюг кДНК із застосуванням зворотної транскриптази.

Процедура

1. Вийміть планшет для ПЛР CF із термоциклера.
2. За допомогою піпетки перемішайте суміш FSM + RVT 10 разів. Переконайтеся, що суміш FSM + RVT абсолютно однорідна.
3. Додайте в кожну лунку для зразка по 8 мкл суміші FSM + RVT.
4. За допомогою піпетки перемішайте 10 разів.
5. Утилізуйте основну суміш FSM + RVT, що залишилася.
6. Нанесіть ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР CF.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
7. Змішайте на вихровій мішалці за 1200 об/хв протягом 1 хвилини.
8. Відцентрифугуйте за 280 × g протягом 1 хвилини.
9. Помістіть на термоциклер і запустіть програму 1stSS.
Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).
10. Коли зразки досягнуть температури 4 °C, негайно перейдіть до наступного кроку.
Перші зразки можна зберігати за температури 4 °C до 5 хвилин.

Синтез другого ланцюга кДНК

Цей процес видаляє матрицю РНК і синтезує дволанцюгову кДНК.

Підготування

1. Підготовка SSM:
 - a. Щоб перемішати, переверніть ємність 10 разів.
 - b. Нетривалий час відцентрифугуйте. Реагент може містити білі частинки, пов'язані з продуктом. Жодних дій виконувати не потрібно. Вплив на ефективність продукту відсутній.

Процедура

1. Вийміть планшет для ПЛР CF із термоциклера.
2. Додайте 25 мкл SSM у кожен лунку для зразка.
3. Нанесіть ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР CF.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
4. Змішайте на вихровій мішалці за 1200 об/хв протягом 1 хвилини.
5. Відцентрифугуйте за 280 × g протягом 1 хвилини.
6. Помістіть на термоциклер і запустіть програму 2ndSS.
Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).
7. Коли зразки досягнуть 4°C, утримуйте протягом 1 хвилини та відразу переходьте до наступного кроку.

Очищення кДНК

У цьому процесі використовується SPB для очищення кДНК від компонентів небажаної реакції. Гранули двічі промивали свіжим 80% EtOH. кДНК елюється за допомогою RSB.

Підготування

1. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - SPB — переконайтеся, що гранули знаходяться за кімнатної температури протягом 30 хвилин.
 - RSB — відкладіть для використання під час процедури.
2. Отримайте свіжий 80 % EtOH в конічній трубці об'ємом 15 мл або 50 мл наступним чином.

Таблиця 15 Одержання свіжого 80% EtOH

Реагент	4 бібліотеки	8 бібліотек	16 бібліотек	24 бібліотеки
100% EtOH, чистий	2 мл	4 мл	8 мл	12 мл
Вода без вмісту РНКаз/ДНКаз	500 мкл	1 мл	2 мл	3 мл

3. Змішайте свіжий 80% EtOH на вихровій мішалці.
4. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI BIND1 (зв'язування кДНК).
5. Накрийте і відкладіть.
6. Встановіть магніт.

Процедура

Зв'язування

1. Вийміть планшет для ПЛР CF із термоциклера.

2. Струсіть SPB протягом 1 хвилини, щоб ресуспендувати гранули.
3. негайно додайте 90 мкл SPB в кожну лунку для зразка планшета BIND1 MIDI.
У разі використання жолобу для дозування SPB під час розподілу аліквот слід додати коефіцієнт допустимого надлишку 1,15, щоб забезпечити достатню кількість матеріалу на зразок. Утилізуйте всі залишки матеріалу після додавання SPB у кожну лунку для зразків.
4. Перенесіть весь об'єм (50 мкл) кожного зразка з планшета для ПЛР CF у відповідну лунку планшета BIND1 MIDI.
5. Утилізуйте порожній планшет для ПЛР CF.
6. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет BIND1 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
7. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
8. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
9. Помістіть планшет BIND1 MIDI на магнітну стійку на 5 хвилин.
10. Тримайте планшет на магнітній стійці. Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки для зразка.

Промивання

1. Промийте гранули наступним чином.
 - a. Залишіть планшет BIND1 MIDI на магнітній стійці та додайте 200 мкл свіжого 80% EtOH у кожну лунку.
 - b. Очікуйте 30 секунд.
 - c. Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки для зразка.
2. Промийте гранули **вдруге**.
3. Використовуйте піпетку з наконечниками для видалення залишкового EtOH з кожної лунки.
4. Утилізуйте невикористаний 80 % EtOH.

Вимивання

1. Вийміть планшет BIND1 MIDI з магнітної стійки.
2. Переверніть або обробіть у вихровій мішалці RSB для змішування.
3. Додайте 22 мкл RSB у кожну лунку для зразка.
4. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет BIND1 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
5. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
6. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 2 хвилин.
7. Помістіть на магнітну стійку на 2 хвилини.
8. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI PCF (очищені фрагменти кДНК).

Якщо ви зупиняєтеся на етапі **ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ** на стор. 51, використовуйте планшет для ПЛР.

9. Перенесіть 20 мкл елюату з кожної лунки для зразка планшета BIND1 MIDI у відповідну лунку планшета PCF.
10. Утилізуйте порожній планшет BIND1 MIDI.
11. Додайте 30 мкл RSB у кожен лунку для зразка планшета PCF.
12. За допомогою піпетки змішайте 10 разів.
13. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет PCF і зберігайте його в холодному стані.
14. Поверніть EPH3, FSM, RVT і SSM на зберігання.
15. Якщо ви обробляєте зразки, отримані тільки з РНК (кДНК), і не зупиняєте процес в точці безпечного зупинення, перейдіть до виконання етапу **Відновлення кінців і додавання А-хвоста** на стор. 55.

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо ви зупиняєте процес, центрифугуйте планшет для ПЛР PCF на 280 g протягом 1 хвилини та зберігайте за температури від -25 °C до -15 °C до 7 днів.

Підготовка до протоколу

Ця підготовка необхідна для виконання етапів протоколу, які ведуть до наступної точки безпечного зупинення.

1. Витягніть контролі ДНК із місця зберігання.
2. Вийміть пробірку з реагентом з коробки та дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування.

Таблиця 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (охолодження) (PN 20031119)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
TEB	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Фрагментація гДНК

Фрагментація гДНК

Цей процес фрагментує гДНК і генерує фрагменти дсДНК з 3' або 5' виступаючими кінцями.

Підготування

1. Для кількісного визначення зразків дотримуйтеся рекомендацій, наведених у розділі **Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот** на стор. 29.
2. Підготуйте TEB — перемішайте шляхом перевертання або на вортексі.

Процедура

Підготування планшета

Для підготування планшета виберіть одну з таких опцій:

- Обробіть зразки гДНК одночасно зі зразками кДНК у планшеті PCF MIDI.
 - a. Промаркуйте планшет PCF MIDI LP (Приготування бібліотеки).
 - b. Зберігайте в холоді та відкладіть для використання на етапі [Перенесення фрагментованої ДНК на стор. 53](#).
- Обробіть зразки гДНК одночасно зі зразками кДНК, поки планшет для ПЛР PCF заморожений.
 - a. Розморозьте планшет для ПЛР PCF до кімнатної температури.
 - b. Відцентрифугуйте на 280 g протягом 1 хвилини.
 - c. За допомогою піпетки змішайте 10 разів.
 - d. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI LP (Приготування бібліотеки).
 - e. Перенесіть 50 мкл кожного зразка з планшета для ПЛР PCF у відповідну лунку планшета LP MIDI.
 - f. Утилізуйте планшет для ПЛР PCF.
 - g. Нанесіть клейку плівку та зберігайте в холоді до моменту [Перенесення фрагментованої ДНК на стор. 53](#).
- Обробіть тільки зразки гДНК.
 - a. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI LP (Приготування бібліотеки).
Якщо ви зупиняєтеся у [ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ на стор. 53](#), використовуйте планшет для ПЛР.
 - b. Охопіть і відкладіть для використання в [Перенесення фрагментованої ДНК на стор. 53](#).

Розведіть гДНК

1. Розморозьте зразки гДНК та контролю ДНК за кімнатної температури.
2. За допомогою піпетки перенесіть кожен зразок гДНК 10 разів, щоб змішати його.
3. Швидко відцентрифугуйте пробірку, щоб зібрати краплі.
4. Переверніть або перемішайте ТЕВ на вортексі.
5. Використовуйте ТЕВ для приготування кожного зразка гДНК в кінцевому об'ємі 52 мкл. Див. наступну таблицю для отримання інформації про вхідні кількості та мінімальні концентрації на основі типу зразка.
 - Для проведення аналізу необхідна мінімальна концентрація екстракції, щоб забезпечити щонайменше 40 мкл ТЕВ в об'ємі 52 мкл.
 - Для ДНК-контролю використовуйте концентрацію, вказану на етикетці пробірки.
 - Щоб запобігти втраті зразка, не піпетуйте до цього розведення менше 2 мкл зразка.

Тип зразка	Вхідна кількість (нг)	Мінімальна концентрація (нг/мкл)
FFPE	40	3,33
Контроль	40	Див. етикетку пробірки

Фрагмент

1. Додайте 52 мкл кожного зразка гДНК в окрему лунку ультразвукової пробірки.



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Повільно завантажте гДНК у пробірку, переконавшись у відсутності повітряних проміжків на дні пробірки. Для отримання додаткової інформації див. розділ [Аналіз на стор. 31](#) та інструкції виробника.

2. Запишіть орієнтацію смужки.
3. Фрагментуйте гДНК за допомогою ультразвукового пристрою.

Перенесення фрагментованої ДНК

1. Переконайтеся, що розташування та індекси планшетів для кожного зразка відповідають прогону, обраному для аналізу через Модуль аналізу TSO Comprehensive (ЄС).
2. Дотримуйтесь інструкцій виробника ультразвукового апарата, щоб відновити зразок. Для деяких типів ультразвукових пробірок потрібне центрифугування для закріплення зразка в пробірці.
3. Для кожного фрагментованого зразка гДНК використовуйте піпетку з тонкими наконечниками, щоб виконати три перенесення по 16,7 мкл у порожню лунку планшета LP MIDI.
4. Наклейте ущільнювальну плівку на планшет LP MIDI.

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо ви зупиняєтеся, наклейте ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР LP та центрифугуйте на 280 g протягом 1 хвилини. Зберігати за температури від -25 °C до -15 °C не більше 7 днів.

Підготовка до протоколу

Ця підготовка необхідна для виконання етапів протоколу, які ведуть до наступної точки безпечного зупинення.

Переконайтеся, що встановлені програми термоциклера після ампліфікації. Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).

1. Підготуйте ємність для льоду або її еквівалент.
2. Вийміть пробірки з реагентами з коробки та дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування.

Таблиця 17 Коробка з TruSight Oncology Comp Library Prep (заморожування) (PN 20031118)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
ERA1-A	Від -25 °C до -15 °C	Підтримуйте холод.	Виконайте відновлення кінців і додавання А-хвоста
ERA1-B	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Виконайте відновлення кінців і додавання А-хвоста
ALB1	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Лігування адаптерів
LIG3	Від -25 °C до -15 °C	Підтримуйте холод.	Лігування адаптерів
SUA1 (синій ковпачок)	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Лігування адаптерів
UMI (білий ковпачок)	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Лігування адаптерів
STL	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Лігування адаптерів
ЕРМ	Від -25 °C до -15 °C	Підтримуйте холод.	Індекс ПЛР

Таблиця 18 Коробка з TruSight Oncology Comp Library Prep (охолодження) (PN 20031119)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
SPB (світло-зелена етикетка)	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури протягом 30 хвилин.	Очищення лігації
RSB	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Очищення лігації

Таблиця 19 Коробка з TruSight Oncology Comp UP Index Primers (PN 20031120)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
UPxx	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте відповідні індексні праймери до кімнатної температури.	Індекс ПЛР

Таблиця 20 Коробка праймерів для індексів CP TruSight Oncology Comp (PN 20031126)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
CPxx	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте відповідні індексні праймери до кімнатної температури.	Індекс ПЛР

Відновлення кінців і додавання А-хвоста

Цей процес відновлює виступаючі кінці, що утворилися внаслідок фрагментації, перетворюючи їх на кінці з А-хвостами за допомогою основної суміші End Repair A-Tailing (ERA1).

Активність 3'-5'-екзонуклеази цієї суміші видаляє 3'-кінці, а активність 5'-3'-полімерази заповнюється 5'-кінцями. 3'-кінці мають А-подібний хвіст під час цієї реакції, щоб запобігти їхньому лігуванню один з одним під час реакції лігування адаптера.

Підготування

- Попередньо прогрійте два інкубатори для мікророзрізків за допомогою термоблоків MIDI наступним чином.
 - Попередньо прогрійте інкубатор з мікророзрізками до температури 30 °C.
 - Попередньо прогрійте інкубатор з мікророзрізками до температури 72 °C.
- Приготуйте вказані далі реагенти.
 - ERA1-A — нетривалий час центрифугуйте, а потім перемішайте піпеткою. Підтримуйте холод.
 - ERA1-B — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. Перевірте наявність осаду. За наявності нагрійте пробірку до 37 °C, а потім перемішайте піпеткою, доки осад не розчиниться.
- Підготуйте основну суміш ERA1 у мікроцентрифужній пробірці.

Таблиця 21 Основна суміш ERA1*

Компонент основної реакційної суміші	4 бібліотеки	8 бібліотек	16 бібліотек	24 бібліотеки	48 бібліотек
ERA1-B	35 мкл	69 мкл	138 мкл	207 мкл	415 мкл
ERA1-A	13,5 мкл	27 мкл	54 мкл	81 мкл	161 мкл

* Ця таблиця враховує допустимий надлишок об'єму. Розрахунки див. у розділі [Поводження з реагентами на стор. 35](#).

- Повільно піпетуйте 10 разів, щоб забезпечити однорідність, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. Зберігайте основну суміш ERA1 холодною.
- Для приготування планшету виберіть одну з таких опцій:
 - Якщо зразки знаходяться в планшеті MIDI, підготуйте наступне.

- a. Повторно промаркуйте планшет MIDI LP2 (Приготування бібліотеки 2).
- b. Якщо деякі зразки знаходяться в окремих планшетах MIDI, перемістіть усі зразки в окремі лунки одного планшета MIDI відповідно до схеми планшета.
- Якщо планшет заморожений, приготуйте наступне.
 - a. Розморозьте планшет для ПЛР PCF або планшет для ПЛР LP до кімнатної температури.
 - b. Відцентрифугуйте за 280 × g протягом 1 хвилини.
 - c. За допомогою піпетки змішайте 10 разів.
 - d. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI LP2 (Приготування бібліотеки 2).
 - e. Перенесіть 50 мкл кожного зразка з планшета для ПЛР PCF або планшета для ПЛР LP у відповідну лунку планшета LP2 MIDI.
 - f. Утилізуйте планшет для ПЛР PCF або LP PCR.

Процедура

1. Додайте 10 мкл реакційної суміші ERA1 у кожен лунку для зразка в планшеті LP2 MIDI.
2. Утилізуйте основну суміш ERA1, що залишилася.
3. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет LP2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
4. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
5. Інкубуйте в попередньо нагрітому інкубаторі для мікророзрізів за температури 30 °C протягом 30 хвилин.
6. негайно перенесіть у другий попередньо нагрітий інкубатор для мікророзрізів.
7. Інкубуйте за температури 72 °C протягом 20 хвилин.
8. Зберігайте планшет LP2 MIDI холодним протягом 5 хвилин.

Лігування адаптерів

Цей процес лігує адаптери до кінців фрагментів кДНК та/або гДНК.

Аналіз TSO Comprehensive (ЄС) включає адаптери SUA1 та UMI.

- Використовуйте адаптери SUA1 зі зразками РНК.
- Використовуйте адаптери UMI зі зразками ДНК.

Підготування

1. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - ALB1 — перемішайте вміст у струшувачі протягом щонайменше 10 секунд, а потім нетривалий час центрифугуйте.

- LIG3 — нетривалий час центрифугуйте, а потім за допомогою піпетки перемішайте. Підтримуйте холод.
- SUA1 — перемішайте вміст у струшувачі протягом щонайменше 10 секунд, а потім нетривалий час центрифугуйте.
- IMT — перемішайте вміст у струшувачі протягом щонайменше 10 секунд, а потім нетривалий час центрифугуйте.
- STL — відкладіть для використання під час процедури.

Процедура

1. Вийміть планшет LP2 MIDI з льоду або еквіваленту.
2. Додайте 60 мкл ALB1 у кожен лунку для зразка планшета LP2 MIDI. ALB1 — це в'язкий розчин. За допомогою піпетки повільно зведіть до мінімуму утворення бульбашок.
3. Додайте 5 мкл LIG3 у кожен лунку для зразка.
4. Додавайте адаптери наступним чином.
Не об'єднуйте разом різні типи адаптерів.
 - [Лунки для зразків РНК] — додайте 10 мкл SUA1 (синій ковпачок) до кожного зразка, отриманого з РНК.
 - [Лунки для зразків ДНК] — додайте 10 мкл UMI (білий ковпачок) до кожного зразка, отриманого з ДНК.
5. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет LP2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
6. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
7. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 30 хвилин.
8. Змішайте STL на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
9. Додайте 5 мкл STL у кожен лунку для зразка планшета LP2 MIDI.
10. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет LP2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
11. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.

Очищення лігації

У цьому процесі використовують SPB для очищення фрагментів кДНК або гДНК, зв'язаних з адаптером, і видаляють небажані продукти. Гранули двічі промивають свіжим 80% етанолом. Зразки, зв'язані адаптером, вимивають за допомогою RSB.

Підготування

1. Приготуйте вказані далі реагенти.

- SPB — переконайтеся, що гранули знаходяться за кімнатної температури протягом 30 хвилин.
 - RSB — відкладіть для використання під час процедури.
2. Отримайте свіжий 80% EtOH в конічній пробірці об'ємом 15 мл або 50 мл.

Таблиця 22 Приготування свіжого 80% етанолу

Реагент	4 бібліотеки	8 бібліотек	16 бібліотек	24 бібліотеки	48 бібліотек
100% EtOH, чистий	2 мл	4 мл	8 мл	12 мл	24 мл
Вода без вмісту РНКази/ДНКази	500 мкл	1 мл	2 мл	3 мл	6 мл

3. Змішайте свіжий 80% EtOH на вихровій мішалці.
4. Встановіть магніт.

Процедура

Зв'язування

1. Струсіть SPB протягом 1 хвилини, щоб ресуспендувати гранули.
2. негайно додайте 112 мкл SPB в кожну лунку для зразка в планшет LP2 MIDI.
У разі використання жолобу для дозування SPB під час розподілу аліквот слід додати коефіцієнт допустимого надлишку 1,15, щоб забезпечити достатню кількість матеріалу на зразок. Утилізуйте всі залишки матеріалу після додавання SPB у кожну лунку для зразків.
3. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет LP2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
4. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
5. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
6. Помістіть планшет LP2 MIDI на магнітну стійку на 10 хвилин.
7. Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки для зразка.

Промивання

1. Промийте гранули наступним чином.
 - a. Зберігайте планшет LP2 MIDI на магнітній стійці та додайте 200 мкл свіжого 80% EtOH у кожную лунку для зразка.
 - b. Очікуйте 30 секунд.
 - c. Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки для зразка.
2. Промийте гранули **вдруге**.
3. Використовуйте піпетку з наконечниками для видалення залишкового EtOH з кожної лунки.
4. Утилізуйте невикористаний 80 % EtOH.

Вимивання

1. Вийміть планшет LP2 MIDI з магнітної стійки.
2. Переверніть або обробіть у вихровій мішалці RSB для змішування.
3. Додайте 27,5 мкл RSB у кожную лунку для зразка.
4. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет LP2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
5. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
6. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 2 хвилин.
7. Помістіть планшет LP2 MIDI на магнітну стійку на 2 хвилини.
8. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет для ПЛР LS (зразки бібліотеки).
9. Перенесіть 25 мкл кожного елюату з планшета LP2 MIDI у відповідну лунку планшета LS PCR.
10. Утилізуйте порожній планшет LP2 MIDI.

Індекс ПЛР

На цьому етапі фрагменти бібліотеки ампліфікують за допомогою праймерів, які додають індексні послідовності для мультиплексування зразків. Одержаний продукт містить повну бібліотеку фрагментів кДНК та/або ДНК, фланкованих адаптерами, необхідними для генерації кластерів.

Підготування

1. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - EPM — зберігайте в холоді.
 - UPxx — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. UPxx — це індексний праймер, вибраний на екрані Create Run (Створити пробіг) в програмному забезпеченні Local Run Manager під час налаштування прогону.

- CPxx — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. CPxx — це індексний праймер, вибраний на екрані Create Run (Створити пробіг) в програмному забезпеченні Local Run Manager під час налаштування прогону.
2. Переконайтеся, що індекси для кожного зразка відповідають прогону, запланованому через Модуль аналізу TSO Comprehensive (ЄС) під час налаштування прогону. Обов'язково дотримуйтесь інструкцій щодо вибору в розділі [Кількість бібліотек та вибір індексів на стор. 37](#).

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

Невідповідність між зразками та індексуєчими праймерами завадить виявленню позитивного зразка та призведе до отримання хибного результату.

Процедура

1. Додайте 5 мкл відповідного індексного праймеру (UPxx або CPxx) у відповідну лунку для зразка в планшеті для ПЛР LS відповідно до вибраних індексів.

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

Працюйте та відкривайте лише одну пробірку з індексним праймером за раз. Відразу після використання закрийте кожну індексну пробірку новою кришкою. Не поєднуйте індексні праймери.

2. Змішайте EPM на вихровій мішалці протягом 5 секунд, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
3. Додайте 20 мкл EPM у кожну лунку для зразка.
4. Наклейте ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР LS.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
5. Змішайте на вихровій мішалці на 1200 об/хв протягом 1 хвилини.
6. Поверніть реактиви для попередньої ампліфікації до місця зберігання.

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

Виконайте всі наступні кроки в зоні постампліфікації, щоб запобігти переміщенню продукту ампліфікації.

7. Центрифугуйте планшет для ПЛР LS на 280 г протягом 1 хвилини.
8. Помістіть на попередньо запрограмований термоциклер для постампліфікації та запустіть програму I-PCR.
Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).
Якщо ви продовжуєте, див. розділ [Налаштування першої гібридизації на стор. 62](#), дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування реагентів на етапах «Підготовка протоколу».
9. Після завершення програми I-PCR центрифугуйте планшет для ПЛР LS на 280 г протягом 1 хвилини.
10. Повторно промаркуйте планшет ALS (зразки для розширеної бібліотеки).

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо виконуєте зупинення, герметично закрийте планшет для ПЛР ALS і зберігайте його за температури від -25 °C до -15 °C протягом до 30 діб.

Підготовка до протоколу

Ця підготовка необхідна для виконання етапів протоколу, що ведуть до нічної гібридизації.

1. Переконайтеся, що встановлені програми термоциклера після ампліфікації. Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).
2. Вийміть пробірки з реагентами з коробки та дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування.

Таблиця 23 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) (PN 20031123)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
TCB1	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Налаштування першої гібридизації

Таблиця 24 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) (PN 20031121)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
TCA1	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Налаштування першої гібридизації

Таблиця 25 Коробка TruSight Oncology Comp Content Set (PN 20031122)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
OPR1 (червоний ковпачок)	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Налаштування першої гібридизації
OPD2 (білий ковпачок)	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Налаштування першої гібридизації

Налаштування першої гібридизації

Під час цього процесу один пул олігонуклеотидів гібридизується з бібліотеками кДНК, і ще один пул олігонуклеотидів гібридизується з бібліотеками гДНК, одержаними на етапі [Індекс ПЛР на стор. 59](#). Збагачення цільових ділянок вимагає двох стадій гібридизації. Під час першої гібридизації олігонуклеотиди гібридизуються з бібліотеками кДНК та/або гДНК протягом ночі (від 8 годин до 24 годин).

Підготування

1. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - TCB1 — прогрійте пробірку за температури 37 °C протягом 5 хвилин. Змішайте на вихровій мішалці протягом 10 секунд, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.

- TCA1 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - OPR1 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - OPD2 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
2. Якщо планшет для ПЛР ALS зберігався, розморозьте його до кімнатної температури та центрифугуйте на 280 g протягом 1 хвилини. Перемішайте піпеткою.
 3. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет для ПЛР HVB1 (гібридизація 1).

Процедура

1. Перенесіть по 20 мкл кожної бібліотеки кДНК та/або гДНК з планшета для ПЛР ALS у відповідну лунку в планшеті для ПЛР HVB1.
2. Наклейте ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР ALS і відкладіть його. Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
3. Огляньте TCB1 на наявність осаду. За наявності осаду знову прогрійте пробірку та струшуйте її, доки кристали не розчиняться.
4. Додайте 15 мкл TCB1 у кожну лунку бібліотеки на планшеті для ПЛР HVB1.
5. Додайте 10 мкл TCA1 у кожну лунку бібліотеки на планшеті для ПЛР HVB1.
6. Додайте зонди.
Не поєднуйте різні типи зондів разом. Додайте лише один набір зондів на лунку.
 - **[Лунки бібліотеки РНК]** — додайте 5 мкл OPR1 (червоний ковпачок) до кожної бібліотеки, одержаної з РНК.
 - **[Лунки бібліотеки ДНК]** — додайте 5 мкл OPD2 (білий ковпачок) до кожної бібліотеки, отриманої з ДНК.
7. Нанесіть ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР HVB1. Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
8. Струшуйте на 1200 об/хв протягом 2 хвилин.
9. Помістіть на термоциклер і запустіть програму HVB1.
Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).
10. Гібридизуйте за температури 57 °C протягом мінімум 8 годин і максимум до 24 годин.
11. Поверніть реагенти для гібридизації на зберігання.
12. Зберігайте планшет ALS PCR за температури від -25 °C до -15 °C не більше 30 днів.

Підготовка до протоколу

Ця підготовка необхідна для виконання етапів протоколу, які ведуть до наступної точки безпечного зупинення.

На початку дня 2 вийміть пробірки з реагентами з коробки та дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування.

Таблиця 26 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (охолодження) (PN 20031123)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
SMB (темно-синя етикетка)	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури протягом 30 хвилин.	Захоплення цілі один Захоплення цілі два
ET2	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Захоплення цілі один Захоплення цілі два
HP3	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Захоплення цілі один Захоплення цілі два Нормалізація бібліотек
TCB1	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Налаштування другої гібридизації
RSB	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Захоплення цілі два Очищення ампліфікованої збагаченої бібліотеки

Таблиця 27 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (заморожування) (PN 20031121)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
EE2	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Захоплення цілі один Захоплення цілі два Нормалізувати бібліотеки
EEW	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Захоплення цілі один
TCA1	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Налаштування другої гібридизації

Таблиця 28 Коробка TruSight Oncology Comp Content Set (PN 20031122)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
OPR1 (червоний ковпачок)	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Налаштування другої гібридизації
OPD2 (білий ковпачок)	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Налаштування другої гібридизації

Захоплення цілі один

На цьому етапі використовується SMB для захоплення зондів, гібридизованих з цільовими ділянками, що представляють інтерес. Гранули тричі промиваються за допомогою EEW. Збагачені бібліотеки вимивають за допомогою свіжої суміші EE2 + HP3 та нейтралізують за допомогою ET2.

Підготування

1. Попередньо прогрійте інкубатор для мікророзрзків за допомогою термоблоку MIDI до 57°C.
2. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - EEW — змішайте на вихровій мішалці протягом 1 хвилини.
 - EE2 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - HP3 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - SMB — переконайтеся, що гранули знаходяться за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Для цієї процедури обов'язково використовуйте **SMB**, а не SPB.
 - ET2 — відкладіть для використання під час процедури.
3. Приготуйте свіжу суміш для елюювання EE2 + HP3 у мікроцентрифужній пробірці.

Таблиця 29 Суміш для вимивання EE2 + HP3 для захоплення цілі один*

Компонент суміші для вимивання	4 бібліотеки	8 бібліотек	16 бібліотек	24 бібліотеки	48 бібліотек
EE2	114 мкл	228 мкл	456 мкл	684 мкл	1368 мкл
HP3	6 мкл	12 мкл	24 мкл	36 мкл	72 мкл

* Ця таблиця враховує допустимий надлишок об'єму. Розрахунки див. у розділі [Поводження з реагентами на стор. 35](#).

4. Змішайте EE2 + HP3 на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. Відкладіть для [Вимивання на стор. 67](#).
5. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI CAP1 (Захоплення 1).
6. Встановіть магніт.

Процедура

Зв'язування

1. Вийміть планшет для ПЛР HYB1 з термоциклера.
2. Центрифугуйте планшет для ПЛР з HYB1 на 280 g протягом 1 хвилини.
3. Струсіть SMB протягом 1 хвилини, щоб ресуспендувати гранули.

За наявності осаду або гранул переконайтеся, що вони досягли кімнатної температури, перенесіть піпеткою вгору та вниз, щоб вивільнити гранулу, а потім перемішайте на вихровій мішалці для ресуспендування.

4. Негайно додайте 150 мкл SMB у кожну лунку бібліотеки планшета CAP1 MIDI.
У разі використання жолобу для дозування SMB під час розподілу аліквот слід додати коефіцієнт допустимого надлишку 1,15, щоб забезпечити достатню кількість матеріалу на зразок.
5. Після додавання SMB до кожної лунки для зразка утилізуйте весь матеріал, що залишився.
6. Установіть піпетку на 50 мкл і перенесіть весь об'єм кожної бібліотеки з планшета для ПЛР HYB1 у відповідну лунку в планшеті CAP1 MIDI.
7. Утилізуйте порожній планшет для ПЛР HYB1.
8. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет CAP1 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
9. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
10. Інкубуйте в попередньо нагрітому мікроразку інкубатора за температури 57 °C протягом 25 хвилин.
11. Помістіть планшет CAP1 MIDI на магнітну стійку на 2 хвилини.
12. Тримайте планшет на магнітній стійці. Не порушуючи осаду гранул, за допомогою піпетки зберіть 200 мкл та утилізуйте весь супернатант з кожної лунки.



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Негайно перейдіть до наступного кроку ([Промивання на стор. 67](#)). Не допускайте тривалого знаходження гранул у розчині без рідини.

Промивання

1. Промийте гранули наступним чином.
 - a. Вийміть планшет CAP1 MIDI з магнітної стійки.
 - b. Додайте 200 мкл EEW в кожну лунку.
 - c. Використовуйте піпетку, налаштовану на 150 мкл, та прокачайте щонайменше 10 разів для перемішування. Переконайтеся, що всі гранули ресуспендовано.
Переконайтеся в тому, що гранули не присутні, акуратно аспіруючи загальний розчин гранули в наконечнику. Візуально перевірте нижню частину кожної лунки. Якщо присутній осад у вигляді гранул, під час промивання нахиліть кінчик піпетки до осаду, щоб видалити осад. Переконайтеся, що гранули повністю занурені в розчин. Розчин повинен виглядати темно-коричневим і мати однорідну консистенцію.
 - d. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет CAP1 MIDI.
 - e. Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
 - f. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 4 хвилин.
 - g. Інкубуйте в інкубаторі з мікроразками за температури 57 °C протягом 5 хвилин.
 - h. Помістіть планшет CAP1 MIDI на магнітну стійку на 2 хвилини.
 - i. Тримайте планшет на магнітній стійці. Не порушуючи осаду гранул, за допомогою піпетки зберіть 200 мкл та утилізуйте весь супернатант з кожної лунки.
2. Промийте гранули **вдруге**.
3. Промийте гранули **втретє**.
4. Використовуйте піпетку з наконечниками для видалення залишків EEW з кожної лунки.

Вимивання

1. Вийміть планшет CAP1 MIDI з магнітної стійки.
2. Струсіть свіжу суміш EE2 + HP3, а потім недовго відцентрифугуйте.
3. Обережно додайте 17 мкл суміші для вимивання EE2 + HP3 в кожну лунку бібліотеки в планшеті CAP1 MIDI.
4. Утилізуйте суміш для вимивання EE2 + HP3, що залишилася.
5. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет CAP1 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
6. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
7. Помістіть на магнітну стійку на 2 хвилини.
8. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет для ПЛР ELU1 (Вимивання 1).
9. Змішайте ET2 на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
10. Додайте 5 мкл ET2 до кожної відповідної лунки бібліотеки в новий планшет для ПЛР ELU1.
11. Обережно перенесіть 15 мкл елюату з кожної лунки бібліотеки планшета CAP1 MIDI у відповідну лунку на планшеті для ПЛР ELU1.

12. Утилізуйте порожній планшет CAP1 MIDI.
13. Наклейте ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР ELU1.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
14. Струшуйте на 1200 об/хв протягом 2 хвилин.
15. Поверніть EEW на зберігання.

Налаштування другої гібридизації

Цей етап зв'язує цільові ділянки бібліотек збагаченої кДНК і/або гДНК із зондами для захоплення вдруге. Друга гібридизація забезпечує високу специфічність захоплених ділянок. Щоб забезпечити оптимальне збагачення бібліотек, виконуйте другий етап гібридизації при 57 °C протягом мінімум 1,5 години, але не більше 4 годин.

Підготування

1. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - TCB1 — прогрійте пробірку за температури 37 °C протягом 5 хвилин. Змішайте на вихровій мішалці протягом 10 секунд, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - TCA1 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - OPR1 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - OPD2 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.

Процедура

1. Огляньте TCB1 на наявність осаду. За наявності осаду знову прогрійте пробірку та струшуйте до розчинення кристалів.
2. Додайте 15 мкл TCB1 у кожен лунку бібліотеки в планшеті для ПЛР ELU1.
3. Додайте 10 мкл TCA1 у кожен лунку бібліотеки.
4. Додайте в кожен лунку той самий зонд, який використовувався під час першої гібридизації. Додайте лише один набір зондів на лунку.
Не поєднуйте різні типи зондів разом.
 - **[Лунки бібліотеки РНК]** — додайте 5 мкл OPR1 (червоний ковпачок) до кожної бібліотеки, одержаної з РНК.
 - **[Лунки бібліотеки ДНК]** — додайте 5 мкл OPD2 (білий ковпачок) до кожної бібліотеки, отриманої з ДНК.
5. Наклейте ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР ELU1.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
6. Струшуйте на 1200 об/хв протягом 2 хвилин.
7. Помістіть на термоциклер і запустіть програму HYB2.

Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).

8. Гібридизуйте за температури 57 °C протягом мінімум 1,5 години і максимум 4 годин.
9. Поверніть реагенти для гібридизації на зберігання.

Захоплення цілі два

На цьому етапі використовується SMB для захоплення зондів, гібридизованих із цільовими областями, що становлять інтерес. Гранули одноразово промиваються за допомогою RSB. Збагачені бібліотеки вимивають за допомогою свіжої суміші EE2 + HP3 та нейтралізують за допомогою ET2.

Підготування

1. Попередньо нагрійте інкубатор для мікрорізків зі вставкою термоблоку MIDI до 57°C.
2. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - EE2 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - HP3 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - SMB — переконайтеся, що гранули знаходяться за кімнатної температури протягом 30 хвилин. Для цієї процедури обов'язково використовуйте **SMB**, а не SPB.
 - RSB — відкладіть для використання під час процедури.
 - ET2 — відкладіть для використання під час процедури.
3. Приготуйте свіжу суміш для елюювання EE2 + HP3 у мікроцентрифужній пробірці.

Таблиця 30 Суміш для вимивання EE2 + HP3 для захоплення цілі два*

Компонент суміші для вимивання	4 бібліотеки	8 бібліотек	16 бібліотек	24 бібліотеки	48 бібліотек
EE2	114 мкл	228 мкл	456 мкл	684 мкл	1368 мкл
HP3	6 мкл	12 мкл	24 мкл	36 мкл	72 мкл

* Ця таблиця враховує допустимий надлишок об'єму. Розрахунки див. у розділі [Поводження з реагентами на стор. 35](#).

4. Змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. Відкладіть для [Вимивання на стор. 71](#).
5. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI CAP2 (Захоплення 2).
6. Встановіть магніт.

Процедура

Зв'язування

1. Вийміть планшет для ПЛР ELU1 із термоциклера.
2. Центрифугуйте планшет для ПЛР ELU1 на 280 г протягом 1 хвилини.

3. Струсіть SMB протягом 1 хвилини, щоб ресуспендувати гранули.
За наявності осаду або гранули переконайтеся, що вони досягли кімнатної температури, перенесіть піпеткою вгору та вниз, щоб вивільнити гранулу, а потім перемішайте на вихровій мішалці для ресуспендування.
4. Негайно додайте 150 мкл SMB у кожну лунку бібліотеки планшета CAP2 MIDI.
У разі використання жолобу для дозування SMB під час розподілу аліквот слід додати коефіцієнт допустимого надлишку 1,15, щоб забезпечити достатню кількість матеріалу на зразок.
5. Після додавання SMB до кожної лунки для зразка утилізуйте весь матеріал, що залишився.
6. Установіть піпетку на 50 мкл і перенесіть весь об'єм кожної бібліотеки з планшета для ПЛР ELU1 у відповідну лунку планшета CAP2 MIDI.
7. Утилізуйте порожній планшет для ПЛР ELU1.
8. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет CAP2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
9. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
10. Інкубуйте в інкубаторі з мікророзразками за температури 57 °C протягом 25 хвилин.
Якщо ви продовжуєте роботу на етапі [Ампліфікація збагаченої бібліотеки на стор. 73](#), дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування реагентів з розділу «Підготовка до протоколу».
11. Помістіть на магнітну стійку на 2 хвилини.
12. Залишіть планшет CAP2 MIDI на магнітній стійці. Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки.



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Негайно перейдіть до наступного кроку ([Промивання на стор. 70](#)). Не допускайте тривалого знаходження гранул у розчині без рідини.

Промивання

1. Вийміть планшет CAP2 MIDI з магнітної стійки.
2. Переверніть або обробіть у вихровій мішалці RSB для змішування.
3. Додайте в кожну лунку 200 мкл RSB.
4. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет CAP2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
5. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 4 хвилин.
6. Помістіть планшет на магнітну стійку на 2 хвилини.
7. Тримайте планшет на магнітній стійці. Не порушуючи осаду гранул, за допомогою піпетки зберіть 200 мкл та утилізуйте весь супернатант з кожної лунки.
8. За допомогою піпетки з наконечниками видаліть залишок RSB з кожної лунки.

Вимивання

1. Вийміть планшет CAP2 MIDI з магнітної стійки.
2. Струсіть свіжу суміш EE2 + HP3, а потім недовго відцентрифугуйте.
3. Додайте 22 мкл суміші EE2 + HP3 для вимивання в кожен лунку бібліотеки в планшеті CAP2 MIDI.
4. Утилізуйте суміш для вимивання EE2 + HP3, що залишилася.
5. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет CAP2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
6. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
7. Помістіть на магнітну стійку на 2 хвилини.
8. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет для ПЛР ELU2 (Вимивання 2).
9. Змішайте ET2 на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
10. Додайте 5 мкл ET2 до кожної відповідної лунки бібліотеки в новий планшет для ПЛР ELU2.
11. Обережно перенесіть 20 мкл елюату з кожної лунки бібліотеки планшета CAP2 MIDI у відповідну лунку на планшеті для ПЛР ELU2.
12. Утилізуйте порожній планшет CAP2 MIDI.
13. Наклейте ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР ELU2.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
14. Струшуйте на 1200 об/хв протягом 2 хвилин.
15. Поверніть SMB, EE2, HP3, RSB і ET2 у місце зберігання.

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо Ви зупиняєте процес, центрифугуйте планшет для ПЛР ELU2 на 280 g протягом 1 хвилини та зберігайте за температури від -25 °C до -15 °C до 7 днів.

Підготовка до протоколу

Ця підготовка необхідна для виконання етапів протоколу, які ведуть до наступної точки безпечного зупинення.

1. Підготуйте ємність для льоду або щось подібне.
2. Вийміть пробірки з реагентами з коробки та дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування.

Таблиця 31 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (заморожування) (PN 20031121)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
PPC3	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Очищення ампліфікованої збагаченої бібліотеки
ERM	Від -25 °C до -15 °C	Підтримуйте холод.	Очищення ампліфікованої збагаченої бібліотеки

Таблиця 32 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (охолодження) (PN 20031123)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
SPB (світло-зелена етикетка)	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури протягом 30 хвилин.	Очищення ампліфікованої збагаченої бібліотеки
RSB	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Очищення ампліфікованої збагаченої бібліотеки Підготовка до секвенування

Ампліфікація збагаченої бібліотеки

На цьому етапі використовуються праймери для ампліфікації збагачених бібліотек.

Підготування

1. Якщо планшет ELU2 зберігався, розморозьте його до кімнатної температури, а потім центрифугуйте на 280 g протягом 1 хвилини.

Процедура

1. Змішайте на вихровій мішалці PPC3, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
2. Додайте 5 мкл PPC3 у кожен лунку бібліотеки планшета для ПЛР ELU2.
3. Змішайте EPM на вихровій мішалці протягом 5 секунд, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
4. Додайте 20 мкл EPM до кожної лунки бібліотеки.
5. Наклейте ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР ELU2.
Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
6. Струшуйте на 1200 об/хв протягом 2 хвилин.
7. Помістіть на термоциклер і запустіть програму EL-PCR.
Див. розділ [Програмування термоциклерів на стор. 44](#).
Якщо ви продовжуєте роботу на етапі [Нормалізація бібліотеки на стор. 76](#), дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування, наведених у розділі [Підготовка до протоколу](#).
8. Поверніть PPC3 та EPM на зберігання.

Очищення ампліфікованих збагачених бібліотек

На цьому етапі використовується SPB для очищення збагачених бібліотек від компонентів небажаної реакції. Гранули двічі промивають свіжим 80 % етанолом. Бібліотеки елюються за допомогою RSB.

Підготування

1. Приготуйте вказані далі реагенти.
 - SPB — переконайтеся, що гранули знаходяться за кімнатної температури протягом 30 хвилин.
Для цієї процедури використовуйте **SPB**, а не SMB.
 - RSB — відкладіть для використання під час процедури.
2. Приготуйте свіжий 80 % етанол у конічній пробірці на 15 мл або 50 мл.

Таблиця 33 Приготування свіжого 80 % етанолу

Реагент	4 бібліотеки	8 бібліотек	16 бібліотек	24 бібліотеки	48 бібліотек
100% EtOH, чистий	2 мл	4 мл	8 мл	12 мл	24 мл
Вода без вмісту РНКази/ДНКази	500 мкл	1 мл	2 мл	3 мл	6 мл

- Змішайте свіжий 80% етанол (EtOH) на вортексі.
- Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI BIND2 (Очищення зв'язування).
- Встановіть магніт.

Процедура

Зв'язування

- Вийміть планшет для ПЛР ELU2 з термоциклера.
- Відцентрифугуйте планшет для ПЛР ELU2 за 280 × g протягом 1 хвилини.
- Змішайте SPB на вихровій мішалці протягом 1 хвилини, щоб ресуспендувати гранули.
- Негайно додайте 110 мкл SPB в кожну лунку бібліотеки планшета BIND2 MIDI.
- Перенесіть 50 мкл кожної бібліотеки з планшета для ПЛР ELU2 у відповідну лунку планшета BIND2 MIDI.
- Утилізуйте порожній планшет для ПЛР ELU2.
- Наклейте клейкий ущільнювач на планшет BIND2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
- Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
- Інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
- Помістіть планшет BIND2 MIDI на магнітну стійку на 5 хвилин.
- Тримайте планшет на магнітній стійці. Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки.

Промивання

- Промийте гранули наступним чином.
 - Залишіть планшет BIND2 MIDI на магнітній стійці та додайте 200 мкл свіжого 80% EtOH у кожну лунку.
 - Очікуйте 30 секунд.
 - Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки.
- Промийте гранули **вдруге**.

- Використовуйте піпетку з наконечниками для видалення залишкового EtOH з кожної лунки.
- Утилізуйте невикористаний 80 % EtOH.

Вимивання

- Вийміть планшет BIND2 MIDI з магнітної стійки.
- Переверніть або обробіть у вихровій мішалці для змішування RSB.
- Додайте 32 мкл RSB у кожну лунку бібліотеки.
- Наклейте клейкий ущільнювач на планшет BIND2 MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
- Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
- Інкубуйте за кімнатної температури протягом 2 хвилин.
- Помістіть на магнітну стійку на 2 хвилини.
- Промаркуйте новий 96-лунковий планшет для ПЛР PL (очищені бібліотеки).
- Перенесіть 30 мкл кожного елюату з планшета BIND2 MIDI у відповідну лунку планшета ПЛР PL.
- Утилізуйте порожній планшет BIND2 MIDI.
- Нанесіть клейку плівку на планшет для ПЛР PL.
- Поверніть SPB і RSB на зберігання.

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо ви зупиняєте процес, центрифугуйте планшет для ПЛР PL на 280 г протягом 1 хвилини та зберігайте за температури від -25 °C до -15 °C до 30 днів.

Підготовка до протоколу

Ця підготовка необхідна для виконання етапів протоколу, які ведуть до наступної точки безпечного зупинення.

- Вийміть пробірки з реагентами з коробки та дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування.

Таблиця 34 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) (PN 20031121)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
LNA1	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Нормалізувати бібліотеки
EE2	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури.	Нормалізувати бібліотеки

Таблиця 35 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) (PN 20031123)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
LNB1	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури протягом 30 хвилин.	Нормалізація бібліотек
HP3	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Нормалізація бібліотек Підготовка до секвенування
LNW1	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Нормалізація бібліотек
LNS1	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Нормалізація бібліотек

2. Якщо ви продовжуєте роботу на етапі [Підготування для секвенування на стор. 80](#) у той самий день, дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування, наведених у розділі [Підготовка до протоколу](#).

Нормалізація бібліотеки

У цьому процесі використовується LNB1 плюс добавки (LNA1) для нормалізації кількості кожної бібліотеки, щоб забезпечити рівномірне представлення бібліотеки в об'єднаних бібліотеках. Гранули промиваються двічі за допомогою LNW1. Бібліотеки вимиваються свіжою сумішшю EE2 + HP3 та нейтралізуються за допомогою LNS1.

Підготування

- Приготуйте вказані далі реагенти.
 - LNB1 — переконайтеся, що гранули знаходяться за кімнатної температури протягом 30 хвилин.
 - LNA1 — змішайте на вихровій мішалці.
 - EE2 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - HP3 — змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
 - LNW1 — змішайте на вихровій мішалці. Відкладіть для використання в процедурі.
 - LNS1 — змішайте на вихровій мішалці. Відкладіть для використання в процедурі.
- Щоб ресуспендувати гранули, обробіть їх у струшувачі LNB1 протягом 1 хвилини. Переверніть пробірку LNB1, щоб переконатись, що всі гранули ресуспендовані.
- Використовуйте піпетку об'ємом 800 мкл, щоб прокапати LNB1 вгору та вниз 10 разів, щоб забезпечити ресуспендування.
- Негайно приготуйте свіжу суміш LNA1 + LNB1 Master Mix у конічній пробірці.

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

Повністю ресуспендуйте гранулу LNB1 у нижній частині пробірки, щоб запобігти нерівній щільності кластера.

Таблиця 36 Суміш LNA1 + LNB1 Master Mix*

Компонент основної реакційної суміші	4 бібліотеки	8 бібліотек	16 бібліотек	24 бібліотеки	48 бібліотек
LNA1	305 мкл	610 мкл	1219 мкл	1829 мкл	3658 мкл
LNB1	55 мкл	110 мкл	221 мкл	331 мкл	662 мкл

* Ця таблиця враховує допустимий надлишок об'єму. Розрахунки див. у розділі [Поводження з реагентами на стор. 35](#).

- Змішайте на вихровій мішалці основну суміш LNA1 + LNB1. Відкладіть для [Зв'язування на стор. 77](#).
- Приготуйте свіжу суміш для вимивання EE2 + HP3 в мікроцентрифужній пробірці.

Таблиця 37 Суміш для вимивання EE2 + HP3 для нормалізації бібліотек*

Компонент суміші для вимивання	4 бібліотеки	8 бібліотек	16 бібліотек	24 бібліотеки	48 бібліотек
EE2	152 мкл	304 мкл	608 мкл	912 мкл	1824 мкл
HP3	8 мкл	16 мкл	32 мкл	48 мкл	96 мкл

* Ця таблиця враховує допустимий надлишок об'єму. Розрахунки див. у розділі [Поводження з реагентами на стор. 35](#).

- Змішайте свіжу елюційну суміш на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. Відкладіть для [Вимивання на стор. 78](#).
- Якщо планшет для ПЛР із PL зберігався, розморозьте його до кімнатної температури, центрифугуйте на 280 g протягом 1 хвилини. Перемішайте піпеткою.
- Промаркуйте новий 96-лунковий планшет MIDI BBN (нормалізація на основі гранул).
- Встановіть магніт.

Процедура**Зв'язування**

- Перемішайте основну суміш LNA1+LNB1 на вортексі.
- Негайно додайте 45 мкл суміші LNA1 + LNB1 у кожну лунку бібліотеки планшета BBN MIDI.
- Утилізуйте основну суміш LNA1 + LNB1, що залишилася.
- Додайте 20 мкл кожної бібліотеки з планшета ПЛР PL у відповідну лунку планшета BBN MIDI.
- Наклейте клейкий ущільнювач на планшет BBN MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
- Струшуйте на 1800 об/хв протягом 30 хвилин.

7. Наклейте клейову плівку на планшет для ПЛР PL і поверніться до зберігання.
8. Помістіть планшет BBN MIDI на магнітну стійку на 2 хвилини.
9. Тримайте планшет на магнітній стійці. Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки.

Промивання

1. Промийте гранули наступним чином.
 - a. Зніміть планшет BBN MIDI з магнітної стійки.
 - b. Додайте 45 мкл LNW1 у кожну лунку бібліотеки.
 - c. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет BBN MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
 - d. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 5 хвилин.
 - e. Помістіть планшет BBN MIDI на магнітну стійку на 2 хвилини.
 - f. Тримайте планшет на магнітній стійці. Не порушуючи осад гранул, використовуйте піпетку, встановлену на 200 мкл, щоб видалити та утилізувати весь супернатант з кожної лунки.
2. Промийте гранули **вдруге**.
3. Використовуйте піпетку з наконечниками, щоб видалити залишки супернатанту з кожної лунки.

Вимивання

1. Зніміть планшет BBN MIDI з магнітної стійки.
2. Струсіть свіжу суміш EE2 + HP3, а потім недовго відцентрифугуйте.
3. Додайте 32 мкл розчину EE2 + HP3 у кожну лунку бібліотеки планшета BBN MIDI.
4. Утилізуйте суміш для вимивання, що залишилася.
5. Наклейте клейкий ущільнювач на планшет BBN MIDI.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
6. Струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
7. Помістіть на магнітну стійку на 2 хвилини.
8. Промаркуйте новий 96-лунковий планшет для ПЛР NL (нормалізовані бібліотеки).
9. Обережно перенесіть 30 мкл елюату з кожної лунки бібліотеки планшета BBN MIDI у відповідну лунку планшета для ПЛР NL.



ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Якщо гранули аспіруються в наконечники піпеток, перед переходом до наступного етапу процедури вилийте гранули назад у планшет на магнітній стійці та зачекайте, доки рідина не стане прозорою (~2 хвилини).

10. Утилізуйте порожній планшет BBN MIDI.
11. Перемішайте LNS1 на вортексі.

12. Додайте 30 мкл LNS1 у кожну лунку бібліотеки в новий планшет для ПЛР NL.
13. Перемішайте піпеткою п'ять разів.
14. Нанесіть ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР NL.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
15. Поверніть LNB1, LNA1, EE2, LNW1 та LNS1 на зберігання.

ТОЧКА БЕЗПЕЧНОГО ЗУПИНЕННЯ

Якщо Ви зупиняєте процес, центрифугуйте планшет для ПЛР NL на 280 g протягом 1 хвилини та зберігайте за температури від -25 °C до -15 °C протягом 32 днів.

Підготовка до протоколу

Ця підготовка необхідна для виконання етапів протоколу, що ведуть до секвенування.

Розпочніть підготовку витратних матеріалів для секвенування з набору реагентів NextSeq 550Dx високої потужності версії 2.5 (300 циклів) (PN 20028871) принаймні за годину до використання.

1. Вийміть буфер для розведення бібліотеки (HT1) зі зберігання за температури від -25 °C до -15 °C. Розморозьте до кімнатної температури. Після розморожування зберігайте в холоді.
2. Дотримуйтесь інструкцій з підготовки, наведених у документі *Довідковий посібник до приладу NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)* для інших витратних матеріалів у наборі.
 - Картридж із реагентами NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 циклів)
 - Картридж із буферами NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 циклів)
 - Картридж NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 циклів)
3. Вийміть пробірки з реагентами з коробки та дотримуйтесь інструкцій щодо розморожування.

Таблиця 38 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (Заморожування) (PN 20031121)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
PhiX Internal Control (Внутрішній контроль PhiX) (PX3 або PhiX)	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте до кімнатної температури. Після розморожування зберігайте в холоді.	Підготовка до секвенування

Таблиця 39 Коробка TruSight Oncology Comp Enrichment (охолодження) (PN 20031123)

Реагент	Зберігання	Інструкції з розморожування	Етап протоколу
HP3	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Підготовка до секвенування
RSB (рожева етикетка)	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури.	Підготовка до секвенування

Підготування для секвенування

Кожен прогін секвенування ДНК і РНК повинен включати позитивний контроль і NTC. Кожні NTC для ДНК і РНК секвенуються повторно, якщо необхідно, таким чином, щоб кожен прогін містив NTC. Кожний прогін ДНК і РНК включає окремий позитивний контроль.

Підготування

1. Перегляньте вказівки з розділу *Кількість бібліотек та вибір індексів на стор. 37*.
2. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як dHP3 (розведений HP3).
3. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як dPhiX (розведений PhiX).
4. Попередньо нагрійте термоблок до 96°C для мікроцентрифужних пробірок.
5. Підготуйте ємність для льоду або щось подібне.

Розведення та денатурування контролю PhiX

1. Змішайте HP3 на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
2. З'єднайте наведені далі об'єми в мікроцентрифужній пробірці dHP3.
 - 10 мкл HP3
 - 190 мкл води без-вмісту РНКаз/ДНКаз
3. Змішайте dHP3 на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
4. Переверніть або змішайте RSB на вихровій мішалці.
5. Змішайте контроль PhiX на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
6. З'єднайте наведені далі об'єми в мікроцентрифужній пробірці dPhiX.
 - 8 мкл RSB
 - 2 мкл контролю PhiX
7. Додайте 10 мкл dHP3 в пробірку dPhiX.
8. Утилізуйте пробірку dHP3.
9. Змішайте пробірку dPhiX на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
10. Інкубуйте dPhiX за кімнатної температури протягом 5 хвилин до денатурації.
11. Змішайте HT1 на вихровій мішалці.
12. Негайно додайте 980 мкл попередньо охолодженої HT1 до dPhiX.
13. Змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
14. Зберігайте PhiX холодним до використання в препараті для другого розведення.
Кінцева концентрація становить 20 пМ dPhiX.
15. Поверніть PhiX, HP3 та RSB на зберігання.

Об'єднання в пул та денатурація бібліотек для TSO Comprehensive (ЄС)

1. Якщо планшет для ПЛР NL зберігався, розморозьте його до кімнатної температури, а потім центрифугуйте протягом 1 хвилини на 280 g.

2. За допомогою багатоканального піпеткового набору об'ємом 30 мкл обережно перемішайте за допомогою піпетки бібліотеки в планшеті для ПЛР NL п'ять разів.
Використовуйте нові наконечники для кожної бібліотеки.

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

Переконайтеся, що бібліотеки добре змішані для оптимальної ефективності.

3. Виберіть один із наведених нижче варіантів для об'єднання, денатурації та розведення бібліотек.
- **[Варіант 1]** Секвенуйте бібліотеки, отримані зі зразків РНК і зразків ДНК одночасно. Див. [Варіант 1. Бібліотеки ДНК і РНК разом на стор. 82.](#)
 - **[Варіант 2]** Секвенуйте бібліотеки, отримані лише зі зразків ДНК. Див. [Варіант 2. Бібліотеки лише ДНК на стор. 83.](#)
 - **[Варіант 3]** Секвенуйте бібліотеки, отримані лише зі зразків РНК. Див. [Варіант 3. Бібліотеки лише для РНК на стор. 84.](#)

Варіант 1. Бібліотеки ДНК і РНК разом

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як PRL (Бібліотеки об'єднаних РНК).
2. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як PDL (Бібліотеки об'єднаних ДНК).
3. Перенесіть 10 мкл кожної нормалізованої бібліотеки РНК (кДНК) з планшета з NL у пробірку PRL.
Не об'єднуйте дві бібліотеки з однаковим індексним праймером.
4. Перенесіть по 10 мкл кожної нормалізованої бібліотеки ДНК з планшета NL у пробірку PDL.
Не об'єднуйте дві бібліотеки з однаковим індексним праймером.
5. Нанесіть ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР NL.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
6. Струсіть пробірки PRL та PDL, щоб перемішати їх вміст.
7. Нетривалий час відцентрифугуйте пробірки PRL і PDL.
8. Інкубуйте пробірки PRL і PDL у термоблоці за температури 96 °C протягом 2 хвилин.
9. Зберігайте пробірки PRL та PDL у холодному стані протягом 5 хвилин.
10. Змішайте пробірки PRL та PDL на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
11. Зберігайте пробірки PRL та PDL холодними.

Підготуйте перше розведення

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як DIL1 (Розведення 1).
2. Перенесіть 20 мкл PDL у порожню пробірку DIL1.
3. Додайте 5 мкл PRL у пробірку DIL1.
4. Утилізуйте пробірки PDL і PRL.
5. Додайте 475 мкл попередньо охолодженого HT1 у пробірку DIL1 (розведення 1:20).

6. Змішайте DIL1 на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.

Підготуйте друге розведення

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку на 2,0 мл як DIL2 (Розведення 2).
2. Перенесіть 40 мкл DIL1 у порожню пробірку DIL2.
3. Утилізуйте пробірку DIL1.
4. Додайте 1660 мкл попередньо охолодженого HT1 у пробірку DIL2 (розведення 1:850).
5. Змішайте підготовлений 20 pM dPhiX на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
6. Додайте 2,5 мкл підготовленого 20 pM dPhiX у пробірку DIL2.
7. Змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
8. Завантажте 1300 мкл DIL2 у розморожений картридж NextSeq 550Dx із високопродуктивним реагентом версії 2 (300 циклів).
Для отримання додаткової інформації див. *Довідковий посібник до приладу NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)*.
9. Утилізуйте пробірку DIL2.
10. Центрифугуйте планшет для ПЛР із НВ на 280 г протягом 1 хвилини, а потім зберігайте за температури від -25 °C до -15 °C протягом 32 днів.
11. Перейдіть до секвенування.
Для отримання додаткової інформації див. *Довідковий посібник до приладу NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)*.

Варіант 2. Бібліотеки лише ДНК

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як PDL (Бібліотеки об'єднаних ДНК).
2. Перенесіть 10 мкл кожної нормалізованої бібліотеки ДНК з планшета NL у пробірку PDL.
Не об'єднуйте дві бібліотеки з однаковим індексним праймером.
3. Нанесіть ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР NL.
Повністю загерметизуйте краї та лунки.
4. Змішайте пробірку PDL на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
5. Інкубуйте пробірку PDL у термоблоці за температури 96 °C протягом 2 хвилин.
6. Зберігайте пробірку PDL холодною протягом 5 хвилин.
7. Змішайте пробірку PDL на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
8. Зберігайте пробірку PDL холодною.

Підготуйте перше розведення

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як DIL1 (Розведення 1).
2. Перенесіть 10 мкл PDL у порожню пробірку DIL1.
3. Утилізуйте пробірку PDL.
4. Додайте 190 мкл попередньо охолодженого HT1 у пробірку DIL1 (розведення 1:20).
5. Змішайте DIL1 на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.

Підготуйте друге розведення

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку на 2,0 мл як DIL2 (Розведення 2).
2. Перенесіть 40 мкл DIL1 у порожню пробірку DIL2.
3. Утилізуйте пробірку DIL1.
4. Додайте 1660 мкл попередньо охолодженого HT1 у пробірку DIL2 (розведення 1:850).
5. Струшуйте підготовлені 20 пМ dPhiX, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
6. Додайте 2,5 мкл підготовленого 20 пМ dPhiX у пробірку DIL2.
7. Змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
8. Завантажте 1300 мкл DIL2 у розморожений картридж NextSeq 550Dx із високопродуктивним реагентом версії 2 (300 циклів).

Для отримання додаткової інформації див. *Довідковий посібник до приладу NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)*.

9. Утилізуйте пробірку DIL2.
10. Центрифугуйте планшет для ПЛР із НВ на 280 г протягом 1 хвилини, а потім зберігайте за температури від -25 °C до -15 °C протягом 32 днів.
11. Перейдіть до секвенування.

Для отримання додаткової інформації див. *Довідковий посібник до приладу NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)*.

Варіант 3. Бібліотеки лише для РНК

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як PRL (Бібліотеки об'єднаних РНК).
2. Перенесіть 10 мкл кожної нормалізованої бібліотеки РНК (кДНК) з планшету з NL у пробірку PRL. Не об'єднуйте дві бібліотеки з однаковим індексним праймером.
3. Нанесіть ущільнювальну плівку на планшет для ПЛР NL. Повністю загерметизуйте краї та лунки, щоб запобігти випаровуванню.
4. Змішайте пробірку PRL на вихровій мішалці.
5. Швидко відцентрифугуйте пробірку з PRL.
6. Інкубуйте пробірку PRL у термоблоці за температури 96 °C протягом 2 хвилин.

7. Зберігайте пробірку PRL холодною протягом 5 хвилин.
8. Змішайте пробірку PRL на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
9. Зберігайте пробірку PRL холодною.

Підготуйте перше розведення

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку як DIL1 (Розведення 1).
2. Перенесіть 10 мкл PRL у порожню пробірку DIL1.
3. Утилізуйте пробірку PRL.
4. Додайте 190 мкл попередньо охолодженого HT1 у пробірку DIL1 (розведення 1:20).
5. Змішайте DIL1 на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.

Підготуйте друге розведення

1. Промаркуйте мікроцентрифужну пробірку на 2,0 мл як DIL2 (Розведення 2).
2. Перенесіть 40 мкл DIL1 у порожню пробірку DIL2.
3. Утилізуйте пробірку DIL1.
4. Додайте 1646 мкл попередньо охолодженого HT1 у пробірку DIL2 (розведення 1:843).
5. Струшуйте підготовлені 20 пМ dPhiX, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
6. Додайте 16,7 мкл підготовленого 20 пМ dPhiX у пробірку DIL2.
7. Змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
8. Завантажте 1300 мкл DIL2 у розморожений картридж NextSeq 550Dx із високопродуктивним реагентом версії 2 (300 циклів).

Для отримання додаткової інформації див. *Довідковий посібник до приладу NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)*.

9. Утилізуйте пробірку DIL2.
10. Центрифугуйте планшет для ПЛР із НВ на 280 г протягом 1 хвилини та зберігайте за температури від -25 °C до -15 °C протягом 32 днів.
11. Перейдіть до секвенування.

Для отримання додаткової інформації див. *Довідковий посібник до приладу NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)*.

Інтерпретація результатів

Результати секвенування аналізу TSO Comprehensive (EC) повідомляються для кожного зразка окремо у звіті PDF та звіті JSON. На рівні зразка також створюється звіт про низьку глибину (`LowDepthReport.tsv`).

На рівні прогону створюються такі вихідні файли:

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

У звітах PDF та JSON відображаються лише варіанти, які проходять контроль якості.

Для отримання детальної інформації про аналіз див. *Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EC) (документ № 200008661)*.

Результати супутньої діагностики

Для кожного цільового призначення супутньої діагностики (CDx) існує три можливі результати:

- **Positive** (Позитивний) — виявлено варіант або біомаркер, що класифікується як рівень 1 (CDx).
- **Not detected** (Не виявлено) — у зразку не виявлено варіантів або біомаркерів, пов'язаних із цільовим призначенням CDx. Тип пухлини, обраний для зразка, підходить для CDx.
- **No result** (Немає результату) — визначення статусу варіанта неможливе з однієї або декількох з наступних причин:
 - Цільове призначення CDx не застосовується до протестованого зразка, оскільки тип пухлини, вибраний для зразка, не підходить для типу пухлини CDx.
 - Під час прогону секвенування не було виконано специфікації контролю якості.
 - Бібліотека не пройшла обов'язкові вимоги контролю якості.
 - Відповідну нуклеїнову кислоту не тестували.

Усі результати цільового використання CDx відображаються в розділі Companion Diagnostic Results (Результати супутньої діагностики) звіту JSON. У розділі Companion Diagnostic Results (Результати супутньої діагностики) PDF-звіту перелічені лише цільові випадки використання з позитивним результатом.

Варіанти профілювання пухлини

TSO Comprehensive (EC) призначений для повідомлення про соматичні варіанти при повідомленні про варіанти з доказами клінічної значущості або варіанти з потенційною клінічною значущістю. Програмне забезпечення для аналізу TSO Comprehensive (EC) використовує базу знань, що визначає, чи є кожний виявлений і придатний варіант ([Таблиця 2](#)) клінічно значущим або потенційно клінічно значущим на

основі доказів терапевтичних, діагностичних або прогностичних асоціацій. База знань також враховує, чи встановлені зв'язки (чи ні) у досліджуваному типі пухлини. Зв'язки між чутливістю або ризиком розвитку раку не включені до бази знань. Звичайні поліморфізми видаляються.

Для варіантів профілювання пухлини позитивні результати класифікуються як геномні утворення з ознаками клінічної значущості (рівень 2) або геномні утворення з потенційною клінічною значущістю (рівень 3) відповідно до встановленої бази знань та визначеного типу пухлини.

Збої контролю якості не призводять до відсутності результатів для типів варіантів, які стосуються показника контролю якості, який не пройшов перевірку. Для отримання додаткової інформації див. [Таблиця 40](#) і [Таблиця 41](#). Положення профілювання пухлини з недостатньою глибиною перелічені у звіті про низьку глибину, а не у звіті TSO Comprehensive (ЄС).

Контроль якості

- Щоб дізнатися більше про кількісне визначення нуклеїнових кислот та мінімальні вимоги до вхідних матеріалів, див. розділ [Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот на стор. 29](#).
- Прогон секвенування та валідність зразка визначаються автоматично та повідомляються через Модуль аналізу TSO Comprehensive (ЄС). Для отримання детальної інформації про аналіз див. *Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (документ № 200008661)*.
- Звіт TSO Comprehensive (ЄС), доступний у форматах PDF та JSON, підсумовує результати контролю якості. Файли звітів знаходяться в папці аналізу. Розташування папки аналізу (містить звіти PDF та JSON) та папки прогону див. у документі *Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (документ № 200008661)*.

Таблиця 40 TSO Comprehensive (ЄС). Показники контролю якості результатів звіту

Тип вихідних даних	Показник	Специфікація	Опис	Вплив недотримання специфікації*
Прогін секвенування	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Відсоток зчитувань, що проходять через фільтр (PF).	Прогін секвенування анульовано. Для жодного зразка в прогоні не зареєстровано результатів.

Тип вихідних даних	Показник	Специфікація	Опис	Вплив недотримання специфікації*
	PCT_Q30_R1 (%)	$\geq 80,0$	Середній відсоток розпізнаних основ з оцінкою якості Q30 або вище для зчитування 1.	Прогін секвенування анульовано. Для жодного зразка в прогоні не зареєстровано результатів.
	PCT_Q30_R2 (%)	$\geq 80,0$	Середній відсоток розпізнаних основ з оцінкою якості Q30 або вище для зчитування 2.	
Бібліотеки ДНК	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 АБО > 3106 та $P_VALUE \leq 0,049$	Показник, що оцінює ймовірність забруднення за допомогою VAF звичайних варіантів. Оцінка забруднення ґрунтується на розподілі VAF SNP. Значення забруднення P використовується для оцінки високоорганізованих геномів. Це стосується лише тих випадків, коли оцінка забруднення перевищує верхню межу спектрів.	Результати аналізу ДНК не повідомляються.

Тип вихідних даних	Показник	Специфікація	Опис	Вплив недотримання специфікації*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Медіана довжини фрагмента в зразку.	Результати аналізу TMB або малого варіанта ДНК не повідомляються.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (count)	≥ 150	Середнє покриття фрагментів екзона по всіх екзонних основах.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Відсоток основ екзона з покриттям 50X фрагментом.	
	USABLE_MSI_SITES (count)	≥ 40	Кількість центрів MSI, які можна використовувати для розпізнавання MSI (кількість мікросателітних центрів із достатніми показниками зчитувань для визначення мікросателітної нестабільності).	Результати MSI не повідомляються.
	COVERAGE_MAD (count)	$\leq 0,210$	Медіана абсолютних відхилень від медіани нормалізованої кількості кожної цільової області CNV.	Результати ампліфікації генів не повідомлені.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (count)	$\geq 1,0$	Медіанна кількість необроблених контейнерів на ціль CNV.	
Бібліотеки РНК	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Медіана довжини фрагмента в зразку.	Результати злиття або варіанти сплайсингу не повідомляються.

Тип вихідних даних	Показник	Специфікація	Опис	Вплив недотримання специфікації*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (коефіцієнт)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X — це показник однорідності покриття. Для кожного гена, що має щонайменше 500х покриття, обчислюють коефіцієнт варіації охоплення всього тіла гена. Цей показник є медіаною цих значень. Високе значення вказує на високий рівень варіації та вказує на проблему під час підготовки бібліотеки, як-от проблеми з низьким входом зразка та/або витягуванням зонда. Цей показник обчислюється з використанням усіх зчитувань (включаючи зчитування, позначені як дублікати).	

Тип вихідних даних	Показник	Специфікація	Опис	Вплив недотримання специфікації*
	TOTAL_ON_TARGET_READS (count)	$\geq 9\,000\,000$	Загальна кількість зчитувань, які відповідають цільовим областям. Цей показник обчислюється з використанням усіх зчитувань (включаючи зчитування, позначені як дублікати).	

* Успішні результати показують PASS (ПРОЙДЕНО).

Таблиця 41 TSO Comprehensive (ЄС) Показники контролю результатів звіту

Тип вхідних даних	Показник	Специфікація	Вплив недотримання специфікації*
Позитивний контроль	Зовнішній контроль ДНК	Виявлено 23 із 24 зазначених варіантів	Вручну анулюйте зразки пацієнтів на основі результатів контрольних зразків. Програмне забезпечення
	Зовнішній контроль РНК	Виявлено 12 із 13 зазначених варіантів	модуля аналізу не анулює автоматично зразки пацієнтів на основі результатів контрольних зразків.
Контроль без додавання матриці (No Template Control)	Медіана екзонного покриття ДНК для TSO Comprehensive (ЄС)	≤ 8	Вручну анулюйте зразки пацієнтів на основі результатів контрольних зразків. Програмне забезпечення
	РНК-ген вище медіанного порогового значення	≤ 1	модуля аналізу не анулює автоматично зразки пацієнтів на основі результатів контрольних зразків.

* Успішні результати показують PASS (ПРОЙДЕНО).

- Повторіть прогони секвенування, які є недійсними.
- Повторіть тестування бібліотек з такими результатами:
 - контаміновані бібліотеки ДНК;
 - недійсні бібліотеки РНК.
 - Тести можна повторити, щоб отримати більше результатів щодо варіантів або біомаркерів для бібліотек ДНК, які були визнані недійсними для одного, але не для всіх типів варіантів.

- Позитивні контролі оцінюються на розпізнавання варіантів. Якщо позитивні контролі не відповідають специфікаціям розпізнавання варіантів, вручну скасуйте цикл секвенування. Програмне забезпечення модуля аналізу не анулює автоматично зразки пацієнтів на основі результатів контрольних зразків.
- NTC оцінюють відносно медіани охоплення екзонів для ДНК і генів вище медіани граничного значення для РНК. Якщо негативні контролі не відповідають специфікаціям, вручну скасуйте події підготовки бібліотеки та всі пов'язані з ними цикли секвенування. Програмне забезпечення модуля аналізу не анулює автоматично зразки пацієнтів на основі результатів контрольних зразків.
- Виконайте додаткові заходи з контролю якості відповідно до місцевих, державних і/або федеральних норм або вимог до акредитації.

Для отримання додаткової інформації про повторні прогони секвенування або тестування бібліотек див. розділ [Усунення несправностей на стор. 93](#).

Усунення несправностей

Використовуйте наведену нижче таблицю для усунення несправностей у робочому процесі. Якщо прогін секвенування або підготовку бібліотеки зразка не вдається виконати двічі, потрібна додаткова діагностика несправностей. Зверніться до служби технічної підтримки Illumina.

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
Прогін секвенування не відповідає специфікаціям контролю якості.	- Помилка об'єднання - Помилка розведення - Неповна теплова денатурація PRL/PDL - Проблеми з підготовкою витратних матеріалів для секвенування (наприклад, неналежне розморожування, конденсат/сміття на проточній кюветі).	Повторне секвенування бібліотек із ПЛР-планшета з нормалізованими бібліотеками (NL). Див. розділ Підготування для секвенування на стор. 80.
	- Неправильне використання зондів для збагачення (наприклад, використання зондів OPR1 для зразків ДНК, а зондів OPD2 — для зразків РНК). - Помилка в робочому процесі підготовки бібліотеки під час або після першого етапу гібридизації.	Повторіть етапи збагачення для бібліотек з ПЛР-планшета для зразків ампліфікованих бібліотек (ALS). Див. розділ Налаштування першої гібридизації на стор. 62.
	Вимоги до введення зразків не були виконані	Почати підготовку бібліотеки з початку робочого процесу. Див. розділ Денатурація та відпал РНК на стор. 46 або Фрагментація гДНК на стор. 51.

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
Помилка створення звіту або загальна помилка приладу (помилка мережі, помилки завантаження/розвантаження реагентів тощо).	Помилка в робочому процесі підготовки бібліотеки під час або до етапу індексної ПЛР	Повторіть етапи збагачення для бібліотек з ПЛР-планшета для зразків ампліфікованих бібліотек (ALS). Див. розділ Налаштування першої гібридизації на стор. 62.
	Проблема з приладом	Зверніться до служби технічної підтримки Illumina.
	Проблема з програмним забезпеченням або приладом.	Див. Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (документ № 200008661), щоб отримати допомогу зі створенням звітів. Для отримання допомоги зверніться до служби технічної підтримки Illumina.
Бібліотека ДНК не відповідає специфікаціям контролю якості.	Вимоги до введення зразків не були виконані.	Забезпечте належне введення зразків і повторіть підготовку бібліотеки на етапі фрагментації гДНК. Див. розділ Вимоги до зразків на стор. 28 і Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот на стор. 29.

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
	Помилка користувача або обладнання на етапі виконання аналізу.	Повторіть підготовку бібліотеки, починаючи з одного з наведених нижче етапів, залежно від того, на якому етапі ймовірно сталася помилка користувача або обладнання. У разі виникнення невідомих або інших помилок зверніться до служби технічної підтримки Illumina, щоб усунути неполадки під час виконання аналізу. - Повторіть секвенування бібліотек із ПЛР-планшета з нормалізованими бібліотеками (NL). Див. розділ Підготування для секвенування на стор. 80. - Повторіть етапи збагачення для бібліотек з ПЛР-планшета для зразків ампліфікованих бібліотек (ALS). Див. розділ Налаштування першої гібридизації на стор. 62. - Почніть підготовку бібліотеки з початку робочого процесу. Див. розділ Фрагментація гДНК на стор. 51.

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
	Критерії CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE не виконано.	Перегляньте застереження та запобіжні заходи, щоб отримати інформацію про уникнення перехресного забруднення. Перевірте макет планшета та індексацію бібліотеки, щоб переконатися, що бібліотеки з одним і тим самим індексом не секвенувалися разом. Для бібліотек, яких це стосується, почніть підготовку бібліотеки з початку робочого процесу. Див. розділ Фрагментація гДНК на стор. 51. Забруднення могло статися під час екстракції зразка. Можливо, знадобиться повторна екстракція, щоб забезпечити відсутність забруднення зразка.
	Не вдалося використати MSI.	Перегляньте налаштування виробника ультразвукового приладу для використання та експлуатації (включаючи рівень води та тип пробірки). Забезпечте належне введення зразка в аналіз. Див. розділи Вимоги до зразків на стор. 28 і Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот на стор. 29. Може знадобитися нова екстракція зразка та/або повторення етапу фрагментації гДНК, якщо зразок є надмірно фрагментованим або пошкодженим.

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
	Зразок надмірно фрагментований або має пошкодження нуклеїнової кислоти, що впливає на здатність генерувати достатні унікальні бібліотеки.	Перевірте Налаштування конфігурації ультразвукового апарата для фрагментації ДНК на стор. 25 та налаштування виробника ультразвукового апарата для використання та експлуатації (включаючи воду та тип пробірки). Забезпечте належне введення зразка в аналіз. Див. розділи Вимоги до зразків на стор. 28 і Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот на стор. 29 . Може знадобитися нова екстракція зразка та/або повторення етапу фрагментації гДНК, якщо зразок є надмірно фрагментованим або пошкодженим.
Бібліотека РНК не відповідає специфікаціям контролю якості.	Вимоги до введення зразків не були виконані.	Забезпечте належне введення зразка та повторіть підготовку бібліотеки з етапу «Денатурація та відпал РНК». Див. розділи Вимоги до зразків на стор. 28 і Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот на стор. 29 .

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
	Помилка користувача або обладнання на етапі виконання аналізу.	Повторіть підготовку бібліотеки, починаючи з одного з наведених нижче етапів, залежно від того, на якому етапі ймовірно сталася помилка користувача або обладнання. У разі виникнення невідомих або інших помилок зверніться до служби технічної підтримки Illumina, щоб усунути неполадки під час виконання аналізу. - Повторіть секвенування бібліотек із ПЛР-планшета з нормалізованими бібліотеками (NL). Див. розділ Підготування для секвенування на стор. 80. - Повторіть етапи збагачення для бібліотек з ПЛР-планшета для зразків ампліфікованих бібліотек (ALS). Див. розділ Налаштування першої гібридизації на стор. 62. - Почніть підготовку бібліотеки з початку робочого процесу. Див. розділ Денатурація та відпал РНК на стор. 46.
	Зразок надмірно фрагментований або має пошкодження нуклеїнової кислоти, що впливає на здатність генерувати достатні унікальні бібліотеки.	Забезпечте належне введення зразка. Див. розділ Вимоги до зразків на стор. 28 і Екстракція, кількісне визначення та зберігання нуклеїнових кислот на стор. 29. Якщо зразок надмірно фрагментований або пошкоджений, може знадобитися взяття нового зразка.

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
Помилка позитивного контролю (ДНК/РНК).	Вимоги до введення зразків для позитивного контролю не виконано.	Забезпечте належний обсяг вхідного матеріалу для аналізу. Перевірте макет планшета та переконайтеся, що відповідні реагенти (зонди, індекси) знаходяться у відповідних лунках. Забезпечте зберігання позитивного контрольного зразка відповідно до етикетки. Для всіх зразків, які мають позитивний контроль, повторіть підготовку бібліотеки, починаючи з одного з наведених нижче етапів, залежно від того, на якому етапі ймовірно сталася помилка користувача або обладнання. У разі виникнення невідомих або інших помилок зверніться до служби технічної підтримки Illumina, щоб усунути неполадки під час виконання аналізу.
	Помилка користувача або обладнання на етапі виконання аналізу.	- Повторіть секвенування бібліотек із ПЛР-планшета з нормалізованими бібліотеками (NL). Див. розділ Підготування для секвенування на стор. 80. - Повторіть етапи збагачення для бібліотек з ПЛР-планшета для зразків ампліфікованих бібліотек (ALS). Див. розділ Налаштування першої гібридизації на стор. 62. - Почніть підготовку бібліотеки з початку робочого процесу. Див. розділ Денатурація та відпал РНК на стор. 46 або Фрагментація гДНК на стор. 51.

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
Помилка NTC (ДНК/РНК).	Виникло перехресне забруднення або забруднення робочої зони.	Перегляньте розділ «Застереження та запобіжні заходи», щоб отримати інформацію про дезінфекцію робочих зон та уникнення перехресного забруднення. Перевірте макет планшета та індексацію бібліотеки, щоб переконатися, що бібліотеки з тим самим індексом не секвенувалися разом. Повторіть підготовку бібліотеки з початку робочого процесу для всіх бібліотек, які мають спільний контроль без матриці.
Програмне забезпечення вказує на те, що позитивні та/або негативні контролі не були включені в цикл секвенування.	Неправильне призначення типу раку під час планування прогону на Local Run Manager.	Проведіть повторний аналіз з контролями, правильно визначеними відповідно до інструкцій у посібнику з робочого процесу модуля аналізу (див. <i>Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (документ № 200008661)</i>).

Технічні характеристики

TSO Comprehensive (ЄС) є цільовою панеллю NGS, яка виявляє зміни в 517 генах. Малі варіанти ДНК (однонуклеотидні варіанти [SNV], багатонуклеотидні варіанти [MNV], інсерції та делеції) є придатними для звітування з усіх 517 генів. Мутаційне навантаження пухлини подається у вигляді показника, що ґрунтується на кількості недрайверних соматичних варіантів на мегабазу (докладніше див. *Посібник з робочого процесу модуля аналізу Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (ЄС) (документ № 200008661)*). MSI реєструється як статус. Ампліфікація генів може повідомлятися з генів MET і ERBB2. Злиття можуть повідомлятися з 23 генів, зазначених у розділі [Зведена інформація та пояснення аналізу на стор. 1](#). Варіанти сплайсингу можуть повідомлятися з генів MET та EGFR. Для повідомлення необхідно виявити варіанти, отримати докази в аналізі TSO Comprehensive (ЄС) KB та відповідати критеріям на основі типу досліджуваної тканини. Для повідомлення про злиття NTRK необхідно, щоб партнер зі злиття був 5'-, а домен NTRK-кінази — неушкодженим.

Для малих варіантів ДНК репрезентативний підхід до валідації цільових генів у панелі проводився з даними, що представляють SNV, MNV, інсерції та делеції. Для ампліфікації генів, злиття та варіантів сплайсингу аналіз проводили на рівні генів. TMB та MSI оцінювалися за показаннями. Для заявлених

показників CDx щодо злиттів NTRK злиття у зразках FFPE досліджувалися в межах досліджень, зосереджених на показниках ефективності, специфічних для відповідного заявленого показника (таких як межа виявлення, внутрішньолабораторна прецизійність, відтворюваність, точність і клінічна ефективність).

Таблиця 42 наведено визначення показників, обчислених у різних дослідженнях.

Таблиця 42 Визначення показників

Термін дії	Визначення
Відсоток збігу позитивних результатів (PPA)	Відсоток правильно визначених позитивних результатів від загальної кількості позитивних результатів відносно ортогонального методу.
Відсоток збігу негативних результатів (NPA)	Відсоток правильно визначених негативних значень від загальної кількості негативних значень відносно ортогонального методу.
Загальний відсоток збігу (OPA)	Відсоток позитивних і негативних результатів, правильно визначених на основі загального спостереження відносно ортогонального методу.
Відсоток позитивних розпізнавань (PPC)	Відсоток спостережень, які є позитивними для цільового показника, серед спостережень, які очікуються як позитивні для цільового показника.
Відсоток негативних розпізнавань (PNC)	Відсоток спостережень, які є негативними для цільового показника, серед спостережень, які очікуються як негативні для цільового показника.
n/N	Кількість позитивних або негативних спостережень (n), поділених на загальні спостереження (N) для розрахунку PPC або PNC відповідно. Значення n і N можуть бути на різних рівнях (наприклад, варіант або ген) або об'єднані в групі (наприклад, SNV).
Стандартне відхилення (SD)	Показник величини варіації значень змінної відносно її середнього значення.
Відсоток коефіцієнта варіації (%CV)	Стандартне відхилення розділене на середнє значення у відсотках.

Перехресне забруднення

Дослідження перенесення проводилося, щоб перевірити, чи впливають на результати тестування хибно-позитивні результати, отримані внаслідок забруднення від лунки до лунки під час підготовки бібліотеки зразків, а також у разі забруднення між послідовними прогонами секвенування. Цей аналіз проводили для малих варіантів ДНК (що також впливає на TMB), злиттів, ампліфікації генів і MSI. Бібліотеки готували з охарактеризованих зразків у шаховому розташуванні з чергуванням зразків для оцінки забруднення між лунками, а також із чергуванням індексів для оцінки забруднення між послідовними прогонами секвенування під час їх послідовного виконання на одному й тому самому приладі NextSeq 550Dx. Дослідження перехресного забруднення показало нульове забруднення, яке спостерігалася при дослідженні виявлених варіантів у кожному зразку, без виявлення хибнопозитивних результатів.

Два показники контролю якості (CONTAMINATION_SCORE і P_VALUE) були розроблені для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) з метою виявлення забруднення зразків зразками ДНК. Оцінювали чутливість до виявлення забруднення. Зразки пухлинної ДНК FFPE змішували з різними кількостями FFPE зразків нормальної ДНК для створення спеціально забруднених зразків.

Загалом було отримано 1112 спостережень щодо забруднення, а забруднення було виявлено у 95 % (1054) спостережень. Показник виявлення збільшувався до 96 % (939/976), коли відсотковий вміст забруднення становив від 10 % до 90 % (маса/маса). З 37 спостережень між 10–90 % забрудненням, де забруднення не було виявлено, 12 не відповідали специфікації покриття для розпізнавання малих варіантів ДНК. Низьке покриття перешкоджає виявленню забруднення, але малі варіанти ДНК не зменшують будь-який вплив забруднення. П'ятнадцять спостережень не відповідали специфікації ампліфікації гена (медіана кількісної показників КЯ) для розпізнавання ампліфікації гена. Для таких зразків не було зареєстровано результату ампліфікації генів.

Дослідження показало, що аналіз TSO Comprehensive (ЄС) матиме очікувано низький ступінь перехресного забруднення від лунки до лунки або прогону. Ці результати разом із показниками забруднення, що містяться в програмному забезпеченні, зменшують ризик отримання хибних результатів через забруднення зразка.

Оцінка набору для екстрагування нуклеїнових кислот

Три доступні на ринку набори для екстрагування ДНК і РНК оцінювали за допомогою TSO Comprehensive (ЄС). Три набори для екстрагування виділяли як ДНК, так і РНК з однакових зрізів тканини FFPE. Набори відрізнялися за своїми стадіями зв'язування з депарафінізуючим засобом і нуклеїновою кислотою (Таблиця 43). Набір 1 був домінуючим набором для екстрагування, який використовувався для визначення ефективності TSO Comprehensive (ЄС).

Таблиця 43 Характеристики набору

Набір	Депарафінізація агента	Зв'язування нуклеїнової кислоти
1	Власність	Стовпець

Набір	Депарафінізація агента	Зв'язування нуклеїнової кислоти
2	Ксилол	Стовпець
3	Мінеральна олія	Магнітні гранули

Таблиця 44 і Таблиця 45 підсумовують вплив наборів для екстрагування на дійсність бібліотеки та розпізнавання варіантів. Різниця була зареєстрована, якщо середні значення набору для екстрагування значно відрізнялися. Середні відмінності між наборами для екстрагування були розраховані за допомогою набору 1 як контролю, оскільки набір 1 був використаний для екстрагування більшої частини нуклеїнових кислот, що використовувалися для аналітичних досліджень TSO Comprehensive (ЄС). Повідомлялося, що середня різниця відносно набору 1 ілюструє, як різні набори для екстрагування вплинуть на інші аналітичні дослідження TSO Comprehensive (ЄС).

Таблиця 44 Вплив набору для екстрагування на доступність бібліотеки

Тип варіанта	Показники бібліотеки КЯ	Середня різниця відносно набору 1
Малі варіанти ДНК/TMB	Медіана покриття екзону (кількість) Екзон PCT 50X (%) Середній розмір вставки (bp)	Набір 2 нижче на 56 зчитувань Набір 3 вищий на 0,298% Набори 2 і 3 нижче на 3 п. о.
MSI ДНК	Доступні центри MSI	Набір 3 вищий на 8 центрів
Ампліфікація гена ДНК	Покриття MAD (кількість) Медіанна кількість інтервалів	Набір 2 нижче на 0,0043 Набір 2 нижче на 0,5825, набір 3 вище на 0,3086
РНК (варіанти злиття/сплайсингу)	Середній розмір вставки (bp) Журнал (Median CV Gene500X) Усього на цільових показниках	Набір 3 вищий на 2 п. о. Набір 2 вище на 0,029 Відсутність суттєвої різниці

Було виявлено, що набори для екстрагування 2 і 3 мають підвищені допоміжні показники, так що варіанти злиття і сплайсингу поблизу LoD мають більшу ймовірність виявлення через вибір набору для екстрагування.

Таблиця 45 Вплив набору для екстрагування на розпізнавання варіантів

Тип варіанта (одиниці)	Розпізнавання варіантів (середня різниця порівняно з набором 1)
Малі варіанти ДНК (VAF)	Не має технічної значущості Цільові варіанти: дисперсія між наборами була незначною відносно залишкового Нецільові варіанти: відсутність суттєвих відмінностей у перших двох контейнерах VAF. Суттєвих відмінностей у разі, якщо не спостерігається статистичної значущості.

Тип варіанта (одиниці)	Розпізнавання варіантів (середня різниця порівняно з набором 1)
TMB (мутація на мегабазу)	Не має технічної значущості, дисперсія між наборами була незначною відносно залишкового
MSI (% нестабільних ділянок)	Набір 3 нижче на 1,9 % нестабільні центри
Ампліфікація генів (кратна зміна)	Більша кратність зміни набору 2 (0,06) і набору 3 (0,08)
Злиття (підтверджуючі зчитування)	Набір 2 мав 51%, а набір 3 — 23% збільшення кількості підтверджуючих зчитувань.
Варіанти сплайсингу (підтверджуючі зчитування)	Кількість підтверджуючих зчитувань для Набору 2 та Набору 3 зросла на 48%.

Інтерферентні речовини

Оцінювали вплив потенційних ендогенних і екзогенних речовин на функціональні характеристики аналізу TSO Comprehensive (EC). Ендогенні речовини (меланін і гемоглобін) додавали в зразки під час процесу екстракції нуклеїнових кислот. Екзогенні речовини (етанол, ксилол і протеїназа К) були присутні під час процесу екстракції нуклеїнової кислоти, а також їх вносили в очищену нуклеїнову кислоту перед підготовкою бібліотеки. У випадках, коли спостерігалася інтерференція з доданою протеїназою К, під час процесу екстракції також оцінювалися підвищені концентрації протеїнази К. Під час підготовки бібліотеки додавали індексні праймери (15 % і 30 %). За винятком індексних праймерів, до зразків FFPE були додані речовини з головного мозку, молочної залози, товстої кишки, легень, медулярної щитоподібної залози, НДКРЛ, яєчників, простати, слиновиділення, шкіри, м'яких тканин та тканини щитовидної залози — вісім зразків були виділені для аналізу ДНК та 13 були виділені для аналізу РНК. Для індексних праймерів для аналізу ДНК використовували шість зразків FFPE трьох різних типів тканин (щитовидна залоза, сечовий міхур, товста кишка), а для аналізу РНК — п'ять зразків FFPE чотирьох різних типів тканин (легень, щитоподібна залоза, товста кишка, молочна залоза). Для кожного з 16 унікальних зразків не було додано ендогенного контролю, а також буферного або водяного екзогенного контролю. Вплив некрозу оцінювався на підставі іншого набору з восьми FFPE зразків, отриманих від тканин головного мозку, товстої кишки та легень. Для кожного зразка з некрозом не було макродисекційованого контролю некрозу. Для всіх інтерферентів аналізували за допомогою аналізу TSO Comprehensive (EC) в чотирьох повторях на зразок на кожну речовину та порівнювали з відповідними умовами контролю для виявлення малих варіантів ДНК, ампліфікацій генів, злиття РНК та варіантів сплайсингу РНК, а також для статусу MSI та оцінки TMB. Включено варіанти як CDx, так і профілювання пухлини.

Виявлення варіанта ДНК

Меланін (0,2 мкг/мл), гемоглобін (2 мг/мл), етанол (5%), протеїназа К (0,04 мг/мл у нуклеїновій кислоті) та ксилол (0,0001%) не впливають на оцінку TMB, статус MSI, малі варіанти ДНК та ампліфікацію генів.

Визначення варіантів РНК

Дані не підтверджують інтерференції меланіну (0,2 мкг/мл), етанолу (5%) та ксилолу (0,0001%) на варіанти злиття РНК або сплайсингу. Гемоглобін (2 мг/мл) інтерферував (знижував допоміжні показники) трьома різними варіантами сплайсингу в гені MET. Варіант сплайсингу в гені AR (три різні зразки) та один у гені EGFR (один зразок) не зазнав впливу. Якщо в лабораторії виконується аналіз РНК, слід уникати або мінімізувати отримання зрізів із блоку тканини.

Біліназа К (0,04 мг/мл у нуклеїновій кислоті) інтерферувала зі злиттям РНК і варіантами сплайсингу. У процесі екстракції тестували протеїназу К в концентрації 2,6 мг/мл і 5,2 мг/мл, яка в 2 рази і 4 рази перевищувала стандартну концентрацію в доступному для продажу наборі. Злиття інгібували за 4х, але не за 2х протеїнази К. Варіанти сплайсингу інгібували за 2х протеїнази К. Протеїназа К або еквівалентний фермент не повинні збільшуватися під час екстракції зі стандартної концентрації, що надається в наборі для екстракції.

Варіант сплайсингу, що підтверджує зниження показників при підвищенні індексу на 30%, але не при надлишку на 15%.

Некроз

Наявність некротичної тканини до 70 % не впливала на показник TMB, статус MSI або невеликі варіанти ДНК. Варіанти РНК (підтримуючі показники) та виявлення ампліфікації генів (кратна зміна) знижувалися в зразках з некротичним вмістом ≥ 25 % та ≥ 23 % (за площею) в області тканини відповідно. Якщо зрізи зразка містять ≥ 23 % некрозу в загальній площі тканини, некротична тканина повинна бути макродисекційована.

Стабільність

Стабільність у режимі реального часу

Для встановлення терміну придатності набору для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) за умови зберігання згідно з умовами, зазначеними на етикетці, використовували метод стабільності в режимі реального часу. Дизайн дослідження базувався на тестуванні трьох партій реагентів і використовував класичний дизайн дослідження стабільності, описаний у CLSI EP25-A. Набори зберігалися в кінцевій конфігурації протягом усього дослідження за умов зберігання, визначених на етикетці продукту. Заморожені компоненти набору зберігалися за температури від -15°C до -25°C . Компоненти набору для охолодження зберігалися за температури від 2°C до 8°C .

Набори були перевірені на наявність критеріїв зовнішнього вигляду та функціонального випуску наборів у визначені моменти часу. Також було проаналізовано тенденції визначення варіантів та показників контролю якості зразків для контрольного матеріалу контролю якості. Для кожного реагенту було визначено термін придатності. Дати закінчення терміну придатності визначаються на основі дати виготовлення та терміну придатності. Термін придатності набору визначається на основі реагенту, термін придатності якого закінчується раніше.

Стабільність після відкриття набору

Стабільність набору для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) під час використання оцінювалася за стандартних умов використання протягом терміну придатності для підтримки багаторазового використання наборів. Набір реагентів піддавався багаторазовому заморожуванню/розморожуванню та досліджувався на підтримку до 4 використань набору. Крім того, 8 бібліотек РНК і 8 бібліотек ДНК підготовували загалом 3 рази для тестування максимальної кількості підтримуваних бібліотек (24 бібліотеки ДНК і 24 бібліотеки РНК на набір). Усі критерії випуску функціонального набору були дотримані для всіх протестованих циклів заморожування-розморожування та часових точок. Тестування зразків FFPE з реагентами віком ≥ 25 місяців проводилося для оцінки впливу тестування при використанні на розпізнавання варіантів. Якісний аналіз цільових варіантів демонструє, що події використання не вплинули на розпізнавання варіантів.

Стабільність нуклеїнових кислот

Стабільність нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) та пов'язане з ними кількісне визначення для застосування з цим аналізом TSO Comprehensive (ЄС) оцінювали з використанням зразків FFPE різних типів тканин. Блоки FFPE розділяли та всі нуклеїнові кислоти екстрагували одночасно. Виділена нуклеїнова кислота ретельно перемішувалася, кількісно вивчалася, перевірялася на якість нуклеїнової кислоти та розділялася на дві групи одноразових пробірок, які необхідно заморозити протягом двох часових точок: Контролі T0 (вихідний рівень) і аналіз T1 (≥ 28 днів). Усі виділені РНК зберігали за температури від -85°C до -65°C , а всі виділені ДНК зберігали за температури від -25°C до -15°C протягом зазначеного періоду часу, а потім обробляли за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) в декількох повторях та за участю декількох операторів. Умову аналізу T1 порівнювали з контролем щодо статусу MSI, показника TMB, ампліфікації генів, малих варіантів ДНК, зливої РНК та варіантів сплайсингу РНК. Дані вказують на те, що нуклеїнові кислоти та їх відповідна кількісна оцінка для використання з цим аналізом TSO Comprehensive (ЄС) є стабільними протягом періоду до 28 днів у разі зберігання за рекомендованих температур (РНК за температури від -85°C до -65°C та ДНК за температури від -25°C до -15°C).

Стабільність бібліотеки

Стабільність бібліотек із використанням кожної з шести точок безпечного зупинення для аналізу (див. [Таблиця 5](#)) оцінювали за допомогою зразків FFPE різних типів тканин. Контрольні бібліотеки (T0, без точок зупинки) були секвеновані негайно в кінці робочого процесу. Аліквоти з тих самих бібліотек зберігалися в точках зупинки за температури від -25°C до -15°C протягом часу (T1) для підтримки днів, які наводить [Таблиця 5](#). T1 порівнювали з T0 для малих варіантів ДНК, TMB, ампліфікації генів, MSI, злиття

РНК і варіантів сплайсингу РНК з варіантами CDx і профілювання пухлини. Дані вказують на те, що бібліотеки, отримані в результаті аналізу TSO Comprehensive (ЄС), є стабільними відповідно до Інструкцій із застосування.

Стабільність тканин FFPE, змонтованих на предметних скельцях

Стабільність тканин FFPE, змонтованих на предметних скельцях, для використання з аналізом TSO Comprehensive (ЄС) оцінювали шляхом виготовлення зрізів із FFPE-блоків (зрізи товщиною 5 мкм) з різних унікальних зразків, їх нанесення на предметні скельця та подальшого зберігання за кімнатної температури (22 °C) протягом двох часових інтервалів. РНК виділяли та зберігали за температури від -65°C до -85°C, а ДНК виділяли та зберігали за температури від -15°C до -25°C менше ніж за 1 тиждень до тестування. Матеріал нуклеїнової кислоти кількісно оцінювали, а потім обробляли за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) протягом 24 годин для кожної часової точки. У кожній часовій точці кілька повторів і операторів на зразок тестували за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) та порівнювали з часовою точкою T0 для MSI, TMB, ампліфікацій генів, малих варіантів ДНК, злиття РНК і варіантів сплайсингу РНК, включно з варіантами CDx і профілювання пухлини. Було оцінено розпізнавання варіантів, яке відповідало усім критеріям прийнятності, що свідчить про те, що тканини FFPE, змонтовані на предметному склі, для використання в цьому аналізі TSO Comprehensive (ЄС) стабільні за кімнатної температури протягом періоду до 4 тижнів (28 днів). Слід зазначити, що через 4 тижні (28 днів) у зв'язку з поєднанням часу роботи оператора та часу зберігання було виявлено зниження дійсності КЯ бібліотеки MSI на 10 %. Злиття РНК і варіанти сплайсингу мали приблизно 29 % зниження підтверджувальних зчитувань після зберігання на предметних скельцях протягом 4 тижнів (28 днів).

Титрування вхідних даних нуклеїнових кислот

Вхідні дані нуклеїнової кислоти для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) оцінювали шляхом тестування ДНК з 33 FFPE зразків, що охоплюють 17 типів тканин, при вхідних рівнях від 10 нг до 500 нг, і аналізу РНК з 5 FFPE зразків від 5 типів тканин при вхідних рівнях від 10 нг до 85 нг. Були оцінені показники контролю якості бібліотеки, які залежать від зразків. Результати аналізу ДНК продемонстрували, що деякі, але не всі показники контролю якості зразків ДНК реагують на збільшення вхідного сигналу вище номінального вхідного сигналу 40 нг:

- MEDIAN_INSERT_SIZE не реагував на вхідні дані понад 30 нг.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE продемонструвала позитивну кореляцію зі збільшенням вхідних даних.
- PCT_EXON_50X збільшувався зі збільшенням вхідних даних до 80 нг.
- Значення USABLE_MSI_SITES збільшувалося зі збільшенням вхідних даних. Деякі зразки з кількістю менше 40 USABLE_MSI_SITES при 40 нг відповідали специфікації при більш високих вхідних даних, що дозволило б обчислити бал MSI.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET збільшився зі збільшенням кількості вхідних даних.
- Збільшення вхідних даних для збільшення COVERAGE_MAD до верхньої межі специфікації.

Показники КЯ зразка РНК збільшилися (MEDIAN_INSERT_SIZE і TOTAL_ON_TARGET_READS) або зменшилися (MEDIAN_CV_GENE_500X) з 10 до 40 нг, але загалом не змінилися між 40 нг і 85 нг вхідних даних.

Межа холостої проби

Відсоток хибнопозитивних результатів (із загальних очікуваних негативних результатів) оцінювали шляхом повторного тестування нормальних або доброякісних прилеглих тканин, які не повинні містити соматичні варіанти для малих варіантів ДНК, ампліфікацій генів, MSI, злиття РНК і варіантів сплайсингу РНК. Хибнопозитивні результати не аналізували на TMB, оскільки немає граничного значення для клінічних показників. Шість зразків ДНК і 6 зразків FFPE РНК було оброблено у двох примірниках 2 операторами протягом 3 днів для кожної з 2 партій реактивів. Підмножину зразків було повторно об'єднано та повторно секвеновано в 3-кратному форматі, призначеному тільки для ДНК, і в 3-кратному форматі, призначеному тільки для РНК, для оцінки хибнопозитивних результатів із кількома мультиплексними конфігураціями, підтримуваними цим пристроєм. Крім того, було проведено 30 додаткових аналізів РНК у двох примірниках, які були оброблені 1 партією реагенту, розділеною між 2 операторами. Загалом було 168 можливих спостережень щодо ДНК та 228 спостережень щодо РНК, зменшених недійсними бібліотеками для кожного типу варіантів. Відсоток хибнопозитивних результатів розраховували на рівні гена для ампліфікації та на рівні положення (приблизно 1,9 мільйона положень) для малих варіантів ДНК. Відсоток хибнопозитивних результатів для типів варіантів ДНК наведено наведено нижче ([Таблиця 46](#)). TSO Comprehensive (ЄС) не має заявлених показників щодо CDx (рівень 1) для малих варіантів ДНК, тому для рівня 1 не можна повідомляти про хибнопозитивні результати малих варіантів ДНК. 271 хибнопозитивний результат було виправлено за допомогою бази знань TSO Comprehensive (ЄС). Хибнопозитивні результати не були клінічно значущими (рівень 2). Було отримано 4 хибнопозитивних результати на рівні 3, що виникли з 2 варіантів у 4 (2,4%) спостереженнях за 168 спостереженнями. Відсоткова частка хибнопозитивних результатів щодо злиття РНК і варіантів сплайсингу становила 0%, як показує [Таблиця 47](#).

Таблиця 46 Хибнопозитивні результати за типом варіанта ДНК

Тип варіанта	Хибнопозитивні
Ампліфікація генів	0 % (0/9912)
Малі варіанти ДНК	0,0001 % (271/295 801 567)
MSI	0% (0/156)
TMB	Н/Д*

* Хибнопозитивні результати не застосовуються, оскільки TMB реєструється як оцінка та не має якісного результату.

Таблиця 47 Хибнопозитивні за типом варіанта РНК

Тип варіанта	Хибнопозитивні
Злиття	0% (0/227)
Варіант сплайсингу	0% (0/227)

Межа виявлення

Було проведено два дослідження для оцінки меж виявлення для TSO Comprehensive (EC). У дослідженні 1 оцінювалися варіанти малих ДНК RET, злиття RET і злиття NTRK1-3. У дослідженні 2 оцінювалися інші варіанти профілювання пухлини.

Дослідження 1

Визначали межі виявлення (LoD) малих варіантів ДНК NTRK1, NTRK3 і RET, а також злиття NTRK1-3 і RET. LoD — це найнижче значення аналізу (наприклад, частота варіантних алелів або допоміжні зчитування), яке можна виявити послідовно (межа виявлення 95 % або похибка II типу 5 %). У дослідженні використовували тканини FFPE з малими варіантами ДНК RET (медулярний рак щитовидної залози), злиття RET (папілярний рак щитовидної залози, атипова пухлина Spitz) та злиття NTRK1-3 (низькозлоякісна гліома, мультиформна гліобластома, міофібробластична саркома, саркома, секреторний рак молочної залози, рак товстої кишки), а також клітинну лінію з малими варіантами ДНК NTRK1 і NTRK3, яку обробляли FFPE. Кожен зразок розбавляли до щонайменше 5 рівнів тесту (у діапазоні приблизно 0,01–0,10 VAF для малих варіантів ДНК і 2–25 підтверджувальних зчитувань для злиття). Було проведено 18 спостережень для кожного рівня тесту на партію на один варіант, створений 3 операторами та 3 секвенаторами, які ініціювали підготовку бібліотеки у 3 непослідовні дні з 2 повторами для кожного рівня тесту зразка. Було протестовано дві партії реактивів.

Для варіантів ДНК 2 партії аналізували незалежно за допомогою пробіт-регресії або підходу з використанням методу збігу (найнижчий рівень тесту з коефіцієнтом збігу (точкова оцінка) $\geq 95\%$) для визначення LoD для кожного варіанта окремо. Більша LoD для двох партій реактивів була прийнята як межа виявлення варіанту ([Таблиця 48](#)).

Для злиття РНК застосовували лінії клітин FFPE для оцінки значень LoD для кожного гена злиття. Після цього LoD перевіряли за допомогою тканин FFPE із використанням дублікатів бібліотечних препаратів у 3 операторах, 3 приладах і 3 партіях реактивів, щоб створити 54 спостереження для кожного варіанта біля LoD, встановленого за допомогою ліній клітин FFPE. Заявлена межа виявлення для кожного злиття ([Таблиця 49](#)) є найнижчим середнім значенням, що підтримує зчитування, які досягли показника збігу (точкова оцінка) $\geq 95\%$.

Таблиця 48 Межа виявлення для малих варіантів ДНК NTRK1, NTRK3 і RET

Маркер	Chr ¹	Позиція	Еталон	Альтернативний варіант	Межа виявлення (Частота варіантних алелів)
NTRK1 G595R (SNV) ²	Chr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV) ²	Chr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV) ²	Chr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV) ²	Chr15	88472468	C	G	0,027
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 (делеція) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = хромосома² Ці варіанти ДНК аналізували за допомогою пробіт-регресії; інші варіанти ДНК аналізували методом оцінки ймовірності збігу.

Таблиця 49 Межа виявлення для злиттів NTRK і RET

Ген	Злиття	Межа виявлення (підтверджувальні зчитування)
NTRK1	LMNA-NTRK1	12,2
	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Дослідження 2

Оцінювалися межі виявлення (LoD) варіантів профілювання пухлини, які було виявлено аналізом TSO Comprehensive (ЄС). LoD — це найнижче значення аналіту (частота алелів варіанта, кратність зміни або допоміжні зчитування), яке можна виявити послідовно (коефіцієнт 95 % удару або помилка II типу 5 %). Зразки FFPE із 17 типів тканин, що містять варіанти, розводили до декількох рівнів аналізу. Шість спостережень на кожен рівень було зроблено двома операторами, кожен з яких використовував іншу партію реагенту та прилад.

Варіанти ДНК

LoD 10 класів малих варіантів ДНК (загалом 25 варіантів) та 2 ампліфікації генів ДНК (ERBB2 та MET) визначали та узагальнювали як діапазони ([Таблиця 50](#)). Також включено варіанти RET із дослідження 1 LoD. У двох із 3 інсерцій, більших за 5 п. о., LoD становили 0,034 і 0,036 VAF, а в третій — 0,215 VAF. Останнє являло собою введення в область низької складності, де введення додає додаткові повторення, впливає на вирівнювання та потребує більше зчитувань для послідовного виявлення. Отже, деякі геномні контексти з низькою складністю можуть впливати на виявлення інсерцій > 5 п. о.

Таблиця 50 Межа виявлення для малих варіантів ДНК та ампліфікацій генів

Тип (одиниця вимірювання LoD)	Клас варіанту / Геномний контекст	Кількість варіантів	Діапазон (VAF)
Малі варіанти ДНК (частота алелів варіантів)	SNV	5	0,016–0,064
	MNV	3	0,022–0,048
	Інсерція (1–2 п. о.) біля гомополімерних дуплікацій	2	0,086–0,104
	Інсерція (1–2 п. о.) біля динуклеотидних дуплікацій	2	0,038–0,051
	Інсерція (3–5 п. о.)	2	0,030–0,056
	Інсерція (> 5 п. о. і до 25 п. о.)	3	0,034–0,215
	Делеція (1–2 п. о.) біля гомополімерних дуплікацій	2	0,094–0,100
	Делеція (1–2 п. о.) біля динуклеотидних дуплікацій	2	0,033–0,070
	Делеція (3–5 п. о.)	2	0,028–0,064
	Делеція (> 5 і до 25 п. о.)	2	0,047–0,055
Ампліфікація генів (кратна зміна)	За геном (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Аналіз нецільових варіантів проводився зі зразків дослідження 1, які мали щонайменше п'ять рівнів тестування. Кожен нецільовий варіант аналізували окремо, і рівень виявлення (LoD) оцінювали лише для варіантів з принаймні одним рівнем влучання > 0% та ≤ 95%, і принаймні одним рівнем ≥ 95% влучання. [Таблиця 51](#) показує перцентилі разом із мінімальним і максимальним LoD, що спостерігаються за класом для нецільових варіантів. Нецільові варіанти забезпечують більшу кількість варіантів за класом, ніж було випробувано в дослідженні 2, і відповідають діапазонам LoD ([Таблиця 50](#)).

Таблиця 51 Зведена статистика меж виявлення за класом нецільових варіантів (з дослідження 1)

Клас	N	Мін.	25 %	50 %	75 %	90 %	Макс.
SNV	862	0,020	0,047	0,059	0,079	0,097	0,592
MNV	5	0,038	0,040	0,050	0,086	0,095	0,095
Інсерція	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Делеція	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Злиття

LoD визначали для 19 злиттів, що складали 20 генів у панелі TSO Comprehensive (ЄС), які коливалися від 9 до 31,3, що підтверджували зчитування (Таблиця 52). В іншому дослідженні тестували ще 3 гени (NTRK1–3). Ген RET аналізували як у цьому, так і в іншому дослідженні. Шістнадцять злиттів з визначеними LoD мали дані, що узгоджуються із загальною LoD 16, що підтримують зчитування з використанням двосторонньої 95 % верхньої межі впевненості (UCL). Два злиття мали значення LoD 24,7 і 31,3, які не відповідали загальній LoD.

Злиття FGFR2-SRPK2 зі значенням LoD 24,7, що підтверджує зчитування, мали області повторного охоплення в точці розриву, як зазначено програмним забезпеченням аналізу TSO Comprehensive (ЄС). Области повторення в межах точки розриву зазвичай мають більш низькі рівні доказів, оскільки зчитування можуть бути відображені в іншому місці геному або можуть залишатися не вирівняними. Крім того, повторні області роблять процес збирання (використовується для ідентифікації послідовностей злиття) більш складним і вимагають додаткових доказів для побудови правильної послідовності. SEPT14-EGFR є ще одним прикладом злиття з гомологічною послідовністю в точці розриву.

Злиття BCL2-IGHJ5 зі значенням LoD, що становить 31,3 підтверджувальних зчитувань, мало дуже короткий ген (IGHJ5) з точкою розриву біля початку екзону, який потребував проміжкових коротких вирівнювань. Отже, для послідовного виявлення було потрібно більше зчитувань.

Таблиця 52 Межа виявлення для злиттів

Злиття	Точка розриву гена А	Точка розриву гена В	LoD	Часті LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15,8	Так
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13,2	Так
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9,0	Так
KIF5B-RET	32311775	43612032	16,6	Так
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9,5	Так
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17,5	Так
EML4-ALK	42553391	29446394	12,8	Так
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23,7	Так

Злиття	Точка розриву гена А	Точка розриву гена В	LoD	Часті LoD
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12,3	Так
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13,5	Так
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24,7	Ні
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26,3	Так
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9,2	Так
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12,8	Так
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11,2	Так
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16,2	Так
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11,0	Так
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31,3	Ні
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19,0	Так

Варіанти сплайсингу

Два варіанти MET зі сплайсингом PTK та EGFR мали LoD 18,7 та 16,7, відповідно.

Вміст пухлини

Результати дослідження надають рекомендації щодо вмісту пухлини для клінічних зразків. Загалом чим вищий вміст пухлини, тим вищий сигнал (VAF, зміна кратності або допоміжні зчитування) для варіантів пухлини. Рекомендації щодо мінімального вмісту пухлини ґрунтуються на таких спостереженнях. Значення LoD для малих варіантів ДНК не перевищують 0,104 VAF (за винятком введення TP53). Для виявлення драйверних мутацій у пухлині (частота варіантних алелів 0,50) рекомендується використовувати 20%-й вміст пухлини, щоб ці мутації мали 0,10 VAF і були на рівні LoD або вище. За 20% вмісту пухлини гени, ампліфіковані до 5,5-кратної зміни (11 копій), будуть послідовно виявлені на основі межі виявлення 1,8-кратної зміни. При 20% вмісті пухлини, 74 підтверджувальні зчитування будуть послідовно виявлені на основі межі виявлення 14,7.

Відтворюваність

Було проведено два дослідження для оцінки відтворюваності для аналізу TSO Comprehensive (ЄС). Дослідження 1 оцінювало малі варіанти ДНК RET на додаток до варіантів злиття NTRK і RET. У дослідженні 2 оцінювалися додаткові варіанти профілювання пухлини.

Дослідження 1

Це дослідження проводилося для оцінки відтворюваності аналізу TSO Comprehensive (ЄС) в 3 дослідницьких центрах (1 внутрішній, 2 зовнішніх) з 2 операторами на центр, 2 повторами в межах серії та 3 днями непослідовного тестування. Тестування проводилося з використанням панелі відтворюваності, що включає зразки ДНК, що містять специфічні відомі варіанти малої ДНК RET і зразки РНК, що містять специфічні відомі варіанти злиття NTRK1–3 і RET із зафіксованих у формаліні і залитих парафіном (FFPE) зразків тканини і клітинних ліній. Панель містила елементи панелі ДНК і РНК із низькими рівнями варіантів і високими рівнями варіантів із однаковою кількістю компонентів панелі низького та високого рівня для кожного класу варіантів. Елементи панелі високого рівня були націлені приблизно на 2–3 рази вище LoD, а елементи панелі низького рівня були націлені приблизно на LoD. У кожному дослідницькому центрі кожен оператор досліджував елементи панелі у двох повторах 3 рази, створюючи 6 спостережень на один цільовий елемент панелі. У всіх 3 дослідницьких центрах було проведено 36 спостережень на кожний елемент панелі (3 дослідницькі центри/прилади × 2 оператори × 2 повтори в межах циклу × 3 дні початку).

PPC і PNC для таргетних малих варіантів ДНК і таргетних варіантів злиття РНК на високому рівні визначали як первинні кінцеві точки. PPC і PNC для таргетних малих варіантів ДНК і таргетних варіантів злиття РНК на нижньому рівні розраховували як вторинні кінцеві точки. Двосторонні 95% довірчі інтервали (ДІ), пов'язані з усіма кінцевими точками, розраховувалися з використанням методу оцінки Вільсона. Первинні аналізи проводили для оцінки PPC і PNC (з пов'язаними 95% ДІ) у цільових високорівневих компонентах панелі шляхом об'єднання спостережень аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для даної мішені в групі компонентів панелі, що представляють застосовний клас варіантів (наприклад, невеликі варіанти ДНК і злиття РНК) у дослідницьких центрах/приладах, операторах і циклах обробки. Для кожного таргетного варіанту спостереження за аналізом TSO Comprehensive (ЄС) в інших компонентах панелі на високому рівні, направленому на той самий тип варіанту, але не містить того ж варіанту, який визначено правилом більшості, було об'єднано з розрахунком PNC. Загальні PPC і PNC для компонентів цільової панелі низького рівня визначали аналогічним чином.

Малі варіанти ДНК RET

Для високорівневих компонентів малих варіантів ДНК загальний PPC становив 100,0 % (207/207; 95 % ДІ: 98,2–100,0 %) ([Таблиця 53](#)). Загальний показник PNC для високорівневих компонентів панелі з малими варіантами ДНК становив 100,0 % (1035/1035; 95 % ДІ: 99,6–100,0 %) ([Таблиця 54](#)). Для компонентів з низьким рівнем цільових варіантів ДНК загальний PPC для компонентів малих варіантів ДНК низького рівня становив 99,1 % (210/212; 95 % ДІ: від 96,6 % до 99,7 %), а загальний PNC становив 100,0 % (1026/1026; 95 % ДІ: від 99,6 % до 100,0 %).

Таблиця 53 PPC аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для виявлення малих варіантів ДНК RET у цільових компонентів панелі високого та низького рівня

Рівень варіанта	Тип варіанта	Цільовий варіант (нуклеотид)	Цільовий варіант (амінокислота)	N	Середнє значення VAF ¹	PPC (%) (н/н)	95 % ДІ ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	Делеція	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Інсерція	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Усі малі варіанти ДНК високі	Усі малі варіанти ДНК високі	Усі малі варіанти ДНК високі	207	N/3 ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Делеція	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
	Інсерція	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Усі малі варіанти ДНК низькі	Усі малі варіанти ДНК низькі	Усі малі варіанти ДНК низькі	212	N/3 ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Скорочення: N/3, не застосовується; VAF, частота варіантних алелів.² Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

Таблиця 54 PNC TSO Comprehensive (ЄС) аналізу для виявлення малих варіантів ДНК RET у цільових компонентів панелі високого та низького рівня

Рівень варіанта	Тип варіанта	Цільовий варіант (нуклеотид)	Цільовий варіант (амінокислота)	N ¹	PNC (%) (н/н)	95 % ДІ ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 (173/173)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 (172/172)	(97,8, 100,0)
	Делеція	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Інсерція	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Усі малі варіанти ДНК високі	Усі малі варіанти ДНК високі	Усі малі варіанти ДНК високі	1035	100,0 (1035/1035)	(99,6, 100,0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 (143/143)	(97,4, 100,0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Делеція	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Інсерція	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Усі малі варіанти ДНК низькі	Усі малі варіанти ДНК низькі	Усі малі варіанти ДНК низькі	1026	100,0 (1026/1026)	(99,6, 100,0)

¹ Усі спостереження об'єднані з комбінацій компонентів панелі і варіантів, для яких більшість розпізнавань є негативними (цільові варіанти зі злиттям і з розпізнаванням менше ніж 50 % позитивні).

² Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

Нижче (Таблиця 55) показано аналіз компонентів дисперсії частоти варіантних алелів (VAF) за приблизно 36 спостережень для кожного елемента панелі. Стандартне відхилення (SD) та коефіцієнт варіації у відсотках (%CV; загальна кількість та для кожного джерела) розраховували та представляли для кожного цільового малого варіанта ДНК RET.

Таблиця 55 TSO Comprehensive (ЄС). Аналіз відмінностей компонентів тесту VAF у цільових малих ДНК-варіантах компонентів панелі

Рівень варіанта	Тип варіанта	Цільовий варіант (нуклеотид)	Цільовий варіант (амінокислота)	N	Середнє значення VAF	SD ділянки (%CV)	SD оператора (%CV)	SD дня (%CV)	SD повторності	Загальне SD (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (10,8)	0,020 (13,0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6)	0,000 (0,0)	0,005 (3,7)	0,014 (10,2)	0,017 (11,8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1)	0,000 (0,0)	0,002 (1,7)	0,012 (10,7)	0,013 (11,6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (4,4)	0,012 (6,0)	0,015 (7,5)
	Делеція	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)
	Інсерція	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,6)	0,010 (10,1)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (22,2)	0,009 (22,2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0)	0,003 (9,8)	0,002 (6,2)	0,007 (21,7)	0,008 (24,6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,008 (17,5)	0,008 (18,5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0)	0,008 (10,7)	0,000 (0,0)	0,011 (14,9)	0,013 (18,4)
	Делеція	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)
	Інсерція	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)

Злиття NTRK 1–3 і RET

Для компонентів панелі злиття РНК високого рівня загальний показник РРС становив 99,3 % (285/287; 95 % ДІ: 97,5–99,8 %) (Таблиця 56). РРС становив 100 % для кожного високорівневого компонента панелі, за винятком компонента панелі BCAN-NTRK1 (РРС = 94,4 % [34/36; 95 % ДІ: від 81,9 % до 98,5 %]). Загальний показник РРС для компонентів панелі злиття РНК високого рівня становив 100,0 % (1724/1724; 95 % ДІ: 99,8–100,0 %) (Таблиця 57). Для компонентів панелі злиття таргетної РНК низького рівня загальний показник РРС становив 95,4 % (272/285; 95 % ДІ: 92,3 %, 97,3 %), а загальний показник РНС становив 100,0 % (1851/1851; 95 % ДІ: 99,8–100,0 %).

Таблиця 56 РРС аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для виявлення злиття NTRK і RET у цільових компонентів панелі високого та низького рівня

Рівень варіанта	Цільове злиття	N	Середні підтверджувальні зчитування	РРС (%) (н/н)	95%-й ДІ*
~2- 3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 (35/35)	(90,1, 100,0)
	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Усі злиття високі	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 (34/36)	(81,9, 98,5)
	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 (29/36)	(65,0, 90,2)
	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 (33/35)	(81,4, 98,4)
	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 (35/36)	(85,8, 99,5)
	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 (33/34)	(85,1, 99,5)
	Усі злиття низькі	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

Таблиця 57 PNC TSO Comprehensive (ЄС) аналізу для виявлення злиття NTRK і RET у нецільових елементів панелі високого та низького рівня

Рівень варіанту	Цільове злиття	N ¹	PNC (%) (н/н)	95 % ДІ ²
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100,0 (180/180)	(97,9, 100,0)
	BCAN-NTRK1	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	TRIM24-NTRK2	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3	144	100,0 (144/144)	(97,4, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	216	100,0 (216/216)	(98,2, 100,0)
	NCOA4-RET	215	100,0 (215/215)	(98,2, 100,0)
	CCDC6-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Усі злиття — високі	1724	100,0 (1724/1724)	(99,8, 100,0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK2	250	100,0 (250/250)	(98,5, 100,0)
	STRN-NTRK2	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	ETV6-NTRK3	177	100,0 (177/177)	(97,9, 100,0)
	BTBD1-NTRK3	249	100,0 (249/249)	(98,5, 100,0)
	NCOA4-RET	213	100,0 (213/213)	(98,2, 100,0)
	KIF5B-RET	251	100,0 (251/251)	(98,5, 100,0)
	Усі злиття — низькі	1851	100,0 (1851/1851)	(99,8, 100,0)

¹ Усі спостереження об'єднані з комбінацій компонентів панелі і варіантів, для яких основне розпізнавання є негативним (цільові варіанти зі злиттям і з розпізнаванням менше ніж 50 % позитивні).

² Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

Нижче (Таблиця 58) показаний аналіз компонентів дисперсії підтверджувальних зчитувань за приблизно 36 спостереженнями в кожному цільовому злитті. SD та %CV (загалом та для кожного джерела) розраховували та представляли для кожного цільового злиття.

Таблиця 58 TSO Comprehensive (ЄС). Аналіз розбіжностей аналізу допоміжних показників у елементах панелі злиття цільових РНК

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

Дослідження 2

Друге дослідження проводилося для оцінки відтворюваності аналізу TSO Comprehensive (ЄС) в 3 дослідницьких центрах (2 зовнішніх та 1 внутрішній), 2 оператори/інструменти на центр, 3 унікальних партії реактивів, 4 дні тестування (непослідовні) та 2 цикли секвенування на бібліотеку зразків.

Тестування проводилося з використанням зразків виділеної ДНК і РНК з 41 зразка FFPE тканини і 1 лінії клітин FFPE (з 1 зразком FFPE тканини і лінією клітин FFPE, що використовувалася для створення 2 компонентів панелі в кожному). Зразки тканин склалися з наступних типів: сечовий міхур, кістка, головний мозок, молочна залоза, товста кишка, кишка, нирки, печінка, легені, яєчники, простата, шкіра, м'які тканини, живіт, щитовидна залоза та матка. Усього було проаналізовано 44 компоненти панелі, включаючи елементи панелі ДНК із малими варіантами ДНК (SNV, MNV, інсерції та делеції), ампліфікацію генів, різні бали TMB, високі бали MSI та елементи панелі РНК із злиттями та варіантами сплайсингу. Більшість компонентів панелі мали відомі варіанти-мішені при рівнях, що приблизно в 2–3 рази перевищують межу виявлення для певних варіантів (~2–3xLoD).

LoD — це концентрація аналіту, коли спостережувані результати аналізу є позитивними (варіант виявлено відносно граничного значення аналізу TSO Comprehensive (ЄС)) ≥ 95 % часу. Середні спостережувані рівні варіантів були класифіковані як приблизно $< 2 \times \text{LoD}$ (спостережувані рівні варіантів при $< 1,5 \times \text{LoD}$), $\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$ (спостережувані рівні варіантів при від $1,5 \times \text{LoD}$ до $3,4 \times \text{LoD}$) та приблизно $> 3 \times \text{LoD}$ (спостережувані рівні варіантів при $> 3,4 \times \text{LoD}$).

PPC для малих варіантів ДНК, ампліфікацій генів, варіантів MSI-High і варіантів РНК розраховували шляхом об'єднання спостережень у циклах і центрах секвенування. PNC аналогічно розраховували для малих варіантів ДНК, ампліфікацій генів і варіантів РНК. Для кожного відомого цільового варіанта спостереження за аналізом TSO Comprehensive (ЄС) в компонентах панелі того ж типу, але що містять інші варіанти, не отримані з того самого вихідного зразка, або не відповідають більшості правил для цього варіанту (< 50 % виявлень були позитивними) були об'єднані в різних дослідницьких центрах, операторах/приладах, днях, партіях реагентів і циклах секвенування для розрахунку PNC. Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

Малі варіанти ДНК

Нижче (Таблиця 59) показані PPC для цільових малих варіантів ДНК. Для більшості малих варіантів ДНК PPC варіювалися від 91,3% для BRAF SNV до 100%.

Таблиця 59 PPC аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для виявлення малих варіантів ДНК в об'єднаних цільових елементах панелі

Спостережуваний рівень варіанту ¹	Тип варіанта	Цільовий варіант (нуклеотид)	Цільовий варіант (амінокислота)	Середнє значення VAF ²	PPC (%) (н/н)	95 % ДІ ³
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ДЕЛЕЦІЯ	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ДЕЛЕЦІЯ	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ІНСЕРЦІЯ	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ІНСЕРЦІЯ	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
$< 2 \times \text{LoD}$	ІНСЕРЦІЯ	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
$\sim 2\text{--}3 \times \text{LoD}$	ДЕЛЕЦІЯ	chr7_55242465_GGAATTAAGAAGCA_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)

Спостережуваний рівень варіанту ¹	Тип варіанта	Цільовий варіант (нуклеотид)	Цільовий варіант (амінокислота)	Середнє значення VAF ²	PPC (%) (н/н)	95 % ДІ ³
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	ДЕЛЕЦІЯ	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2-3x LoD	ІНСЕРЦІЯ	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_ AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2-3x LoD	ІНСЕРЦІЯ	chr9_139399350_C_ CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ДЕЛЕЦІЯ	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2x LoD	ІНСЕРЦІЯ	chr17_7578470_C_ CGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2-3x LoD	ІНСЕРЦІЯ	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Рівень варіації, розрахований із середньої спостережуваної частоти алелів варіанту.

² Середня частота алелів варіантів, розрахована на основі спостережуваних результатів аналізу.

³ Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

PNC складала 100 % у малих ДНК-варіантах.

Нижче (Таблиця 60) показано аналіз компонентів дисперсії результатів VAF для кожного джерела варіації та загальної варіації всіх компонентів панелі з цільовими малими варіантами ДНК.

Таблиця 60 Аналіз різних компонентів VAF для цільових малих варіантів ДНК

Цільовий варіант (нуклеотид)	N	Середнє значення VAF	SD ділянки (%CV)	SD Оператора (центр) (%CV)	SD дня (центр, оператор) (%CV)	SD партії (%CV)	SD прогону (%CV)	Загальне SD (%CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_ CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_ C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_ GGAATTAAGAAGCA_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_ AGCATACGTGATGATG	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)

Були два цільові малі варіанти ДНК, для яких кількість спостережень була занадто малою для встановлення моделі компонентів дисперсії. Для цих двох цільових варіантів загальне SD становило 0,027 для варіанту chr1_27024001_C_ CG та 0,001 для варіанту chr17_7578470_C_CGGCGG.

Ампліфікація генів

Нижче (Таблиця 61) показані PPC для ампліфікації цільових генів. PPC становили 100,0 % для MET і 100,0 % для ERBB2.

Таблиця 61 PPC аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для виявлення ампліфікації генів у об'єднаних цільових компонентів панелі

Спостережуваний рівень варіанту ¹	Цільовий варіант	Середнє спостережуване значення зміни кратності ²	Відсоток позитивних розпізнавань (%)	95 % ДІ ³
~2-3x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2-3x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Рівень варіанту розраховується на основі середньої спостережуваної кратності зміни.

² Середня кратна зміна, розрахована на основі спостережуваних результатів аналізу.

³ Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

PNC становили 100 % для ампліфікації генів.

Нижче (Таблиця 62) показано аналіз дисперсійних компонентів результатів кратності зміни для кожного джерела варіабельності та загальної варіабельності у всіх компонентах панелі з цільовими ампліфікаціями генів.

Таблиця 62 Аналіз компонентів дисперсії кратної зміни для ампліфікації цільових генів

Цільовий варіант	N	Середня зміна кратності	SD ділянки (%CV)	SD оператора (ділянки) (%CV)	SD дня (ділянки, оператора) (%CV)	SD партії (%CV)	SD прогону (%CV)	Загальне 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

Нижче (Таблиця 63) показані PPC для цільових елементів панелі MSI-High. PPC становили 100 % для обох компонентів панелі MSI-High.

Таблиця 63 PPC аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для виявлення статусу MSI-High в об'єднаних цільових елементах панелі

Елемент панелі	Середній бал MSI ¹	N	Відсоток позитивних розпізнавань (%)	95 % ДІ 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)
Усі учасники		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Середній спостережуваний показник MSI обчислюється на основі спостережуваних результатів аналізу.

² Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

Нижче (Таблиця 64) показано аналіз компонентів дисперсії результатів оцінки MSI для кожного джерела варіації та загальної варіації всіх компонентів панелі, призначених для статусу MSI-High.

Таблиця 64 Аналіз компонентів дисперсії індексу MSI для цільових компонентів панелі MSI-High

Елемент панелі	N	Середній бал MSI	SD ділянки (%CV)	SD оператора (ділянки) (%CV)	SD дня (ділянки, оператора) (%CV)	SD партії (%CV)	SD прогону (%CV)	Загальне 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

Щоб оцінити відтворюваність результатів TMB, було проведено кількісний аналіз результатів у цільових компонентах панелі TMB, що представляло діапазон очікуваних показників TMB. Нижче (Таблиця 65) показано аналіз компонентів дисперсії результатів оцінки TMB для кожного джерела варіації та загальної варіації елементів панелі TMB. Загальний показник SD TMB становив 1,0 (%CV = 13) для одного елемента панелі (середній показник TMB = 7,6) і 1,1 (%CV = 2) для іншого компонента панелі (середній показник TMB = 63,2).

Таблиця 65 Аналіз компонентів дисперсії шкали TMB для цільових компонентів панелі TMB

Елемент панелі*	N	Середній показник TMB	SD ділянки (%CV)	SD оператора (ділянки) (%CV)	SD дня (ділянки, оператора) (%CV)	SD партії (%CV)	SD прогону (%CV)	Загальне 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)

* Був 1 компонент панелі TMB, для якого кількість спостережень була занадто малою (N = 2) для моделі дисперсійних компонентів, які потрібно встановити. Для цього компонента панелі загальне SD становило 1,7.

Варіанти РНК

Нижче ([Таблиця 66](#)) показані РРС для варіантів таргетної РНК. Для більшості варіантів РНК РРС варіювалися від 91,7 % для KIF5B-RET до 100 %.

Таблиця 66 PPC TSO Comprehensive (ЄС) аналізу для виявлення варіантів РНК в об'єднаних цільових компонентах панелі

Спостережуваний рівень варіанту ¹	Тип варіанта	Цільовий варіант	Середні підтверджувальні зчитування ²	PPC (%) (н/н)	95 % ДІ ³
> 3x LoD	Злиття	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Злиття	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Злиття	CD74- ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Злиття	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Злиття	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Злиття	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Злиття	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3x LoD	Злиття	DHX8;ETV4- STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Злиття	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Злиття	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Злиття	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Злиття	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Злиття	HNRNPUL1- AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Злиття	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Злиття	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)

Спостережуваний рівень варіанту ¹	Тип варіанта	Цільовий варіант	Середні підтверджувальні зчитування ²	PPC (%) (н/н)	95 % ДІ ³
< 2x LoD	Злиття	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Злиття	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3x LoD	Варіант сплайсингу	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3x LoD	Варіант сплайсингу	MET пропускання екзона 14	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Рівень варіації, розрахований із середніх спостережуваних підтверджуючих зчитувань.

² Середні підтверджувальні зчитування, розраховані на основі спостережуваних результатів аналізу.

³ Двосторонній 95%-й довірчий інтервал обчислюється за методом оцінки Вілсона.

PNC становила 100 % для кожного варіанта цільової РНК, за винятком злиття FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60 % (984/988; 95 % ДІ: від 98,96 % до 99,84 %)).

Нижче (Таблиця 67) показаний аналіз компонентів дисперсії, що підтверджує результати зчитування для кожного джерела варіації та загальної варіації всіх компонентів панелі з варіантами цільової РНК.

Таблиця 67 Аналіз компонентів дисперсії підтверджувальних зчитувань для цільових варіантів РНК

Цільовий варіант	N	Середні підтверджувальні зчитування	SD ділянки (%CV)	SD оператора (ділянки) (%CV)	SD дня (ділянки, оператора) (%CV)	SD партії (%CV)	SD прогону (%CV)	Загальне 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;GPOC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKN1-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 Варіант зрощення	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
14-й екзон MET без сплайс-варіанта	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Внутрішньолaborаторна точність

Було проведено два дослідження для оцінки внутрішньолaborаторної точності для TSO Comprehensive (ЄС). У дослідженні 1 оцінювалися злиття NTRK і RET, а також малі варіанти ДНК RET. Дослідження 2 оцінювало TMB та MSI.

Дослідження 1

Внутрішньолaborаторну точність оцінювали на предмет злиття NTRK1–3 (гліома низького ступеня злоякісності, мультиформна гліобластома, міофібробластна саркома, секреторний рак молочної залози), злиття RET (рак щитовидної залози та тканина шкіри з невідомого раку) та малих варіантів ДНК RET (медулярний рак щитовидної залози) з FFPE тканинами із зазначених видів раку. Кожний зразок

аналізували за двох рівнів варіантів: ~1x LoD (низький рівень варіанту) і ~2–3x LoD (високий рівень варіанту), за винятком зразка, що містить CCDC6-RET, який аналізували лише за низького рівня варіанту. Кожен зразок на кожному рівні тестування був запущений у двох примірниках у кожній події підготовки бібліотеки для трьох (3) операторів. Кожен оператор розпочав підготовку бібліотеки у три (3) непослідовні початкові дні та секвенував на трьох (3) призначених приладах NextSeq 550Dx. Було протестовано три (3) партії реагентів, що забезпечили 54 спостереження на рівень. Деякі рівні мали менше 54 спостережень через недійсні бібліотеки.

Якісний аналіз

Якісна відповідність розпізнавання варіантів оцінювалася окремо для двох рівнів варіантів для певного варіанта з об'єднаних спостережень по всіх змінних (операторів, партій реагентів, інструментів, днів і повторів). Показники PPC та PNC, а також відповідні двосторонні 95 % довірчі інтервали (бал Вільсона) узагальнює [Таблиця 68](#) (малі варіанти ДНК) та [Таблиця 69](#) (злиття РНК).

При високому рівні варіанту (~2–3x LoD) TSO Comprehensive (ЄС) аналіз продемонстрував 100 % для PPC і PNC для всіх досліджених варіантів.

При низькому рівні варіантів (~1x LoD) PPC для малих варіантів ДНК коливався від 83,3 % до 98,1 %, а PPC для злиття РНК коливався від 90,7 % до 100 %. Для варіантів із PPC < 95 % середні значення VAF (RET C634Y та RET D898_E901del) або підтверджувальних зчитувань (NCOA4-RET і BCAN-NTRK1) були нижче відповідних меж виявлення. На низькому рівні варіантів 100 % PNC було досягнуто для всіх варіантів.

Таблиця 68 Якісні результати для цільових варіантів ДНК

Рівень варіанта	Варіант	Тип варіанта	Середнє значення VAF	PPC (%) (н/н) (95%-й ДІ)	PNC (%) (н/н) (95%-й ДІ)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0,028	83,3 (45/54) (71,3, 91,0)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)
	RET D898_E901del	ДЕЛЕЦІЯ	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*	ДЕЛЕЦІЯ	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Рівень варіанта	Варіант	Тип варіанта	Середнє значення VAF	PPC (%) (н/н) (95%-й ДІ)	PNC (%) (н/н) (95%-й ДІ)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0,095	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (192/192) (98,0, 100,0)
	RET D898_ E901del	ДЕЛЕЦІЯ	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*	ДЕЛЕЦІЯ	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Зміни нуклеотиду перелічено для кожного варіанту в розділі «Межі виявлення», за винятком RET D631_
L633delinsE, який являє собою хромосому 10, положення 43609940, контрольну ACGAGCT, альтернативний варіант А.

Таблиця 69 Якісні результати для цільових злиттів РНК

Рівень варіанта	Злиття	Середні підтверджувальні зчитування	PPC (%) (н/н) (95%-й ДІ)	PNC (%) (н/н) (95%-й ДІ)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (лінія клітин FFPE)	23,1	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	
	KANK1-NTRK3	13,5	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	NCOA4-RET	13,3	90,7 (49/54) (80,1, 96,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	CCDC6-RET	18,7	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (зразок 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (зразок 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2, 99,0)	

Рівень варіанта	Злиття	Середні підтверджувальні зчитування	PPC (%) (н/н) (95%-й ДІ)	PNC (%) (н/н) (95%-й ДІ)
~2-3x LoD	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	LMNA-NTRK1	35,1	99,0 (103/104) (94,8, 99,8)	100,0 (431/431) (99,1, 100,0)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE клітинна лінія)	28,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	
	KANK1-NTRK3	39,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (535/535) (99,3, 100,0)
	NCOA4-RET	24,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (481/481) (99,2, 100,0)
	CCDC6-RET	Н/Д	Не перевірено	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (зразок 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (зразок 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Кількісний аналіз

Аналіз компонентів дисперсії обмеженої максимальної ймовірності (REML) проводився для оцінки загальної варіації основної безперервної змінної (VAF для малих варіантів ДНК та допоміжних показників для злиттів РНК) і оцінки компонентів прецизійності [стандартне відхилення (SD), коефіцієнта варіації (CV)] для кожного джерела варіації [оператори, прилади, дні, партії реагентів, залишкові та загальні]. Результати представлені як [Таблиця 70](#) для малих варіантів ДНК і [Таблиця 71](#) для злиттів РНК.

Варіація VAF зростала із середнім значенням, очікуваним для біноміальної частки. Варіація у підтверджувальних зчитуваннях збільшувалася із середнім значенням, як і очікувалося з даними

підрахунку. Залишковий компонент був найбільшим фактором загальної дисперсії як для малих варіантів ДНК, так і для злиття РНК на обох рівнях, що підтверджує висновок про те, що виявлення цих варіантів операторами, партіями, приладами та днями TSO Comprehensive (ЄС) є надійним.

Таблиця 70 Кількісні результати SD та CV для цільових малих варіантів ДНК

Рівень VAF	Варіант	Тип варіанта	N дійсних спроб	Середнє значення VAF	SD оператора (%CV)	SD приладу (%CV)	SD партії (%CV)	SD дня (%CV)	Залишкове SD (%CV)	Загальне SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_E901del	ДЕЛЕЦІЯ	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	ДЕЛЕЦІЯ	54	0,056	0,000 (0,0)	0,002 (3,0)	0,006 (11,6)	0,000 (0,0)	0,010 (18,5)	0,012 (22,0)
~3x LoD	RET D898_E901del	ДЕЛЕЦІЯ	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	ДЕЛЕЦІЯ	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)

Таблиця 71 Кількісні результати SD і CV для цільових злиттів РНК

Рівень показників підтримки	Злиття	N дійсних спроб	Середні підтверджувальні зчитування	SD оператора (%CV)	SD приладу (%CV)	SD партії (%CV)	SD дня (%CV)	Залишкове SD (%CV)	Загальне SD (%CV)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,33 (12)	0,94 (5)	3,31 (16)	0,83 (4)	5,70 (28)	7,10 (35)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,38 (15)	1,41 (6)	1,78 (8)	0,00 (0)	6,03 (27)	7,28 (33)
	LMNA-NTRK1	52	12,2	1,36 (11)	1,25 (10)	1,59 (13)	0,00 (0)	4,74 (39)	5,33 (44)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,00 (0)	3,18 (16)	4,36 (21)	0,00 (0)	8,30 (41)	9,90 (49)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,28 (14)	2,36 (15)	2,17 (13)	0,00 (0)	4,65 (29)	6,10 (38)
	ETV6-NTRK3 (клітинна лінія)	54	23,1	4,55 (20)	1,18 (5)	0,00 (0)	0,00 (0)	6,73 (29)	8,21 (36)
	KANK1-NTRK3	54	13,5	0,74 (5)	0,11 (1)	1,09 (8)	0,00 (0)	4,22 (31)	4,42 (33)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,67 (13)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,67 (13)	5,09 (38)	5,61 (42)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,00 (0)	1,14 (6)	5,44 (29)	0,00 (0)	6,17 (33)	8,30 (44)
	KIF5B-RET (зразок 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (зразок 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)
2-3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,21 (20)	1,18 (2)	5,68 (10)	2,03 (4)	11,86 (21)	17,44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,22 (15)	0,76 (1)	5,59 (11)	2,89 (5)	11,34 (21)	15,37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35,1	1,47 (4)	5,92 (17)	8,11 (23)	2,92 (8)	10,69 (30)	15,03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,00 (0)	4,07 (8)	7,07 (14)	5,72 (11)	12,91 (25)	16,31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,16 (17)	0,40 (1)	6,40 (15)	0,00 (0)	10,74 (26)	14,41 (35)
	ETV6-NTRK3 (клітинна лінія)	54	28,3	7,93 (28)	1,02 (4)	0,00 (0)	0,00 (0)	9,05 (32)	12,08 (43)
	KANK1-NTRK3	54	39,2	5,10 (13)	0,00 (0)	4,78 (12)	0,00 (0)	9,44 (24)	11,74 (30)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,05 (12)	0,00 (0)	5,92 (24)	0,00 (0)	6,78 (27)	9,50 (38)
	KIF5B-RET (зразок 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (зразок 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Дослідження 2

Внутрішньолабораторну точність оцінювали для TMB та MSI. Для оцінки точності на різних рівнях у діапазоні балів було використано п'ять зразків ДНК недрібноклітинного раку легень (НДРЛ) з FFPE для TMB та сім зразків FFPE колоректального раку для MSI, включаючи як MS-стабільний, так і MSI-високий. Кожний із зразків був проаналізований у двох примірниках трьома (3) операторами, три (3) дні, з трьома (3) бібліотечними підготовками для трьох (3) партій реагентів за допомогою трьох NextSeq 550Dx приладів, що забезпечували 54 спостереження на рівень.

Якісна відповідність оцінювалася на предмет статусу MSI. Аналіз TSO Comprehensive (ЄС) продемонстрував 100% відповідність для проценту позитивних розпізнавань та процент у негативних розпізнавань для статусу MSI. Для TMB аналіз TSO Comprehensive (ЄС) повідомляє про показник TMB; якісна відповідність не застосовується.

Загальну варіацію оцінок TMB і MSI, а також внесок за вихідними показниками (прилад, оператори, партії, дні та залишки) було кількісно визначено з використанням моделі компонентів дисперсії для різних оцінок. Стандартне відхилення (SD) і коефіцієнт варіації (CV) представлені як [Таблиця 72](#) для TMB і [Таблиця 73](#) для MSI за рівнем. Деякі рівні мали менше 54 спостережень через недійсні бібліотеки.

Таблиця 72 Кількісні результати оцінки TMB SD і CV

Рівень	Середній показник TMB	N дійсних спроб	SD оператора (%CV)	SD приладу (%CV)	SD партії (%CV)	SD дня (%CV)	Залишкове SD (%CV)	Загальне 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)

Таблиця 73 Кількісні результати за шкалою MSI SD та CV

Статус MSI	Рівень	Середній показник MSI (%)	N дійсних спроб	SD оператора (%CV)	SD приладу (%CV)	SD партії (%CV)	SD дня (%CV)	Залишкове SD (%CV)	Загальне SD (%CV)
MS-Stable	L1	0,80	53	0,35 (43)	0,00 (0)	0,15 (18)	0,00 (0)	0,52 (66)	0,64 (81)
	L2	5,90	53	0,47 (8)	0,00 (0)	0,84 (14)	0,00 (0)	1,26 (21)	1,58 (27)
MSI-High	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

Варіації показників TMB зазвичай збільшуються із середнім значенням, очікуваним від теоретичного розподілу даних підрахунку. Зміна балів MSI для рівнів біля балу MSI = 50 є більшою, ніж відхилення балів MSI ближче до 0, або 100, що відповідає мінливості теоретичних розподілів пропорційних даних.

Залишковий компонент залишався найбільшим фактором загальної варіабельності для показників MSI та TMB, що підтверджує висновок про те, що оцінки є стійкими для операторів, партій, інструментів і днів. Однак як MSI, так і TMB є складними біомаркерами, і аналітичні характеристики можуть відрізнятися в

різних зразках. Іншими словами, варіація TMB залежить не тільки від значення TMB, але й від складу варіантів у зразку, таких як тип варіанта (SNV, Indel) та рівень VAF (близькість до граничного значення включення). Аналогічно, зміна MSI залежить не лише від значення MSI, але й від складу ділянок у зразку, наприклад, кількості ділянок, які є нестабільними, та обсягу нестабільності на ділянку.

Значення C5 і C95 навколо граничного значення 20,00 % визначали для MSI з використанням профілю прецизійності (Таблиця 74).

Таблиця 74 Інтервал C5-C95 для MSI

Оцінка	C5	C95
MSI	17,17 %	23,32 %

Оцінювали вплив вмісту пухлини на оцінки TMB та MSI. Для більшості зразків вміст пухлини ≥ 30 % мав незначний вплив на бали TMB понад приблизно 10 мутацій на мегабазу. Оцінка TMB залишалася відносно незмінною зі збільшенням вмісту пухлини. Для зразків MSI-High вміст пухлини демонстрував позитивну лінійну кореляцію з балом MSI. Зразки MSI-High залишалися в середньому MSI-High, коли вміст пухлини становив ≥ 30 %. Зразки ендометрію поводитися чітко, відмінно від інших типів тканин, і було виявлено, що для розпізнавання як MSI-High їм потрібен більший вміст пухлини.

Точність профілювання пухлини

Виявлення варіантів за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) порівнювали з результатами еталонних методів. Малі варіанти ДНК і TMB порівнювали із зовнішнім валідованим методом NGS із повним екзомом. Ампліфікацію генів порівнювали з одним і тим самим методом NGS повного екзома або затвердженим методом подвійної гібридизації in-Situ (DISH) для ампліфікації HER2. MSI оцінювали за допомогою валідованого тесту MSI-PCR. Варіанти сплайсингу РНК порівнювали з валідованим кількісним методом ПЛР (qPCR). Злиття ROS1 та ALK порівнювали з валідованими аналізами FISH. Усі інші злиття порівнювали з комбінованим способом, що складається з валідованого аналізу цілого екзома NGS РНК (RNGS1), цільової панелі NGS (RNGS2) і цифрової крапельної ПЛР (ddPCR).

Виявлення малих варіантів ДНК

Виявлення малих варіантів ДНК за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) порівнювали з результатами секвенування повного екзома (WES), в якому використовується WES із відповідними парами нормальних зразків пухлини для розпізнавання зародкових і соматичних малих варіантів. Порівняння між малими варіантами, що складаються з одонуклеотидних варіантів (SNV), інсерцій і делецій, ґрунтувалося на 124 зразках 14 різних типів тканин, які були дійсними як для TSO Comprehensive (ЄС), так і для WES. TSO Comprehensive (ЄС), на відміну від аналізу WES, може виявити багатонуклеотидні варіанти (MNV, 2–3 bp), які потребують фазування. TSO Comprehensive (ЄС) MNV оцінювали як окремі SNV проти WES. Короткий огляд узгодженості на рівні варіанта, включно з відсотками збігу позитивних результатів (PPA) і відсоток збігу негативних результатів (NPA) для всіх варіантів, наведено нижче (Таблиця 75).

Таблиця 75 Короткий огляд відповідності розпізнавань малих варіантів, оцінених за зародковим або соматичним статусом

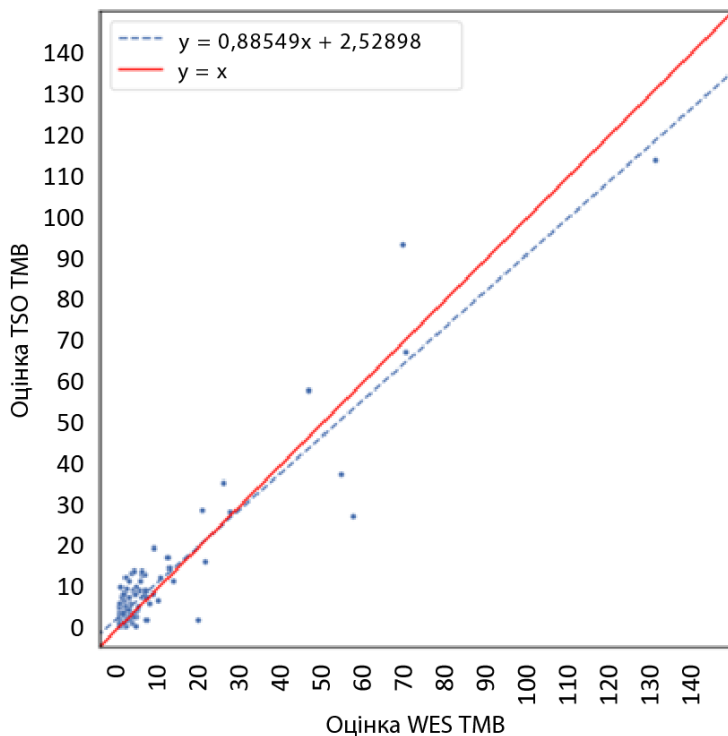
	WES. Соматичні розпізнавання	WES. Зародкові розпізнавання	Не виявлено WES
TSO Comprehensive (ЄС) Виявлено	382	33,163	426
TSO Comprehensive (ЄС) Не виявлено	69	61	70,000,481
Загалом	451	33,224	70,000,907
Відсоток збігу	PPA: 85% (382/451), 95%-й ДІ: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33 163/33 224) 95%-й ДІ: [99,8%, 99,9%]	NPA: > 99% (70 000 481/70 000 907) 95%-й ДІ: [99,999%, 99,999%]

Загалом, TSO Comprehensive (ЄС) виявив 426 варіантів, які не були виявлені за методом WES. Двісті чотири (48%) з цих варіантів мали частоту варіантних алелів нижче порогового значення для виявлень методу WES. Серед інших потенційних хибнопозитивних варіантів були докази того, що варіант виявив метод WES з низькою підтримкою. Крім того, багато варіантів мали дуже низькорівневі докази WES на відповідних нормальних зразках. Цей результат свідчить про те, що ці варіанти були пропущені в пухлині за допомогою WES через нормальне забруднення пухлини.

Виявлення мутаційного навантаження пухлини

Відповідність TMB визначали шляхом порівняння показників TMB (соматичні мутації/мегабаза) між методом WES та TSO Comprehensive (ЄС) для 124 зразків з доступними даними як на основі даних TSO Comprehensive (ЄС) так і на основі WES. Лінійний регресійний аналіз із застосуванням WES як прогностичного показника мав у-перехоплення 2,53, нахил 0,89 і коефіцієнт кореляції Пірсона 0,94 (Малюнок 3).

Малюнок 3 Кореляція оцінки TMB між WES і TSO Comprehensive (ЄС)



Виявлення ампліфікації генів

Виявлення ампліфікації генів за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) порівнювали з результатами того самого аналізу WES з використанням зразків, що співпадають зі звичайною пухлиною, або зразків, що містять тільки пухлину. Загалом було взято 420 зразків, з яких 183 використовували ортогональний метод пухлинної норми, а 237 використовували тільки метод пухлинної тканини. Із 420 зразків для дослідження було вибрано 50 зразків, оскільки вони були позитивними щодо ампліфікації за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) або аналізу попереднього зразка. Ефективність для цих характеризованих зразків коригували із застосуванням середньої поширеності злиття. У комбінованих функціональних характеристиках для охарактеризованих і неохарактеризованих зразків використовували незмінне середньозважене значення. Зразки були одержані з 14 типів тканин і містили

ампліфікації з 55 генів. TSO Comprehensive (ЄС) повідомляє про ампліфікації генів з генів MET і ERBB2. Однак було оцінено точність для всіх 55 генів. Зведені дані щодо розпізнавань ампліфікації генів наведено нижче ([Таблиця 76](#)).

Таблиця 76 Короткий огляд узгодженості для ампліфікації генів

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

* Довірчий інтервал, розрахований за допомогою бутстрепа.

Ампліфікацію ERBB2 (HER2) у тканинах шлунка та молочної залози аналізували окремо від інших ампліфікацій генів із застосуванням методу подвійної гібридизації in-Situ (DISH). Загалом було досліджено 116 зразків молочної залози та шлунку, з яких 64 раніше характеризувалися як HER2-позитивні за допомогою IGH або FISH. Один зразок не пройшов екстракцію, 4 зразки не пройшли перевірку для TSO Comprehensive (ЄС), і 3 зразки не пройшли перевірку для аналізу DISH. Із 108 зразків 20 (18,5%) мали граничні бали (від 1,5 до 2,5) до дати припинення збору даних DISH 2,0. Результати узгодженості, включно з PPA, NPA для всіх зразків і за винятком граничних випадків HER2 DISH, наведені в [Таблиця 77](#).

Таблиця 77 Короткий огляд узгодженості між TSO Comprehensive та DISH HER2, включаючи ампліфікацію гена HER2

Ампліфікація гена HER2 Усі (молочна залоза і шлунок)	HER2 DISH Ампліфікований	HER2 DISH Неампліфікований
TSO Comprehensive (ЄС) Позитивні	17 (включаючи 1 граничний)	13 (включаючи 1 граничний)
TSO Comprehensive (ЄС) Негативні	10 (включаючи 6 граничних)	68 (включаючи 12 граничних)
Процент збігу з граничними випадками	PPA: 63% (17/27) 95%-й ДІ: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95%-й ДІ: [74%, 90%]
Процент збігу, за винятком граничних випадків	PPA: 80% (16/20) 95%-й ДІ: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95%-й ДІ: [72%, 90%]

Виявлення мікросателітної нестабільності

Виявлення мікросателітної нестабільності за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) порівнювали з результатами перевіреного тесту MSI-PCR, у якому для тестування використовуються зразки, що відповідають нормі пухлини. Було порівняно загалом 195 зразків, які відповідали вимозі щодо вмісту пухлини $\geq 30\%$ (для PC-стабільного статусу) та представляли 14 типів тканин. MSI-PCR оцінює 5 центрів і має 3 результати: MSI-Stable (нестабільні ділянки), MSI-Low (одна нестабільна ділянка) та MSI-High (дві або більше нестабільні ділянки). TSO Comprehensive (ЄС) оцінює до 130 мікросателітних ділянок і

класифікує зразки лише як MSI-Stable або MSI-High ($\geq 20\%$ нестабільні ділянки). MSI-Low був згрупований з результатами, що не піддаються MS-Stable впливу MSI-PCR. Аналіз узгодженості показаний нижче (Таблиця 78).

Таблиця 78 Короткий огляд аналізу узгодженості між TSO Comprehensive (ЄС) та MSI-PCR щодо мікросателітної нестабільності ДНК

Статус MSI	ПЛР MSI-High	ПЛР MSI-Low	ПЛР MSI-Stable
TSO Comprehensive (ЄС) Нестабільний (MSI-High)	41	2	0
TSO Comprehensive (ЄС) Стабільний (MS-Stable)	3	0	150
Загалом	44	2	150
Відсоток збігу	PPA: 93 % (41/44) 95%-й ДІ: [82%, 98%]	NPA: 99 % (150/152) 95%-й ДІ: [95%, > 99%]	

Визначення варіанта сплайсингу РНК

Точність виявлення варіантів сплайсингу розраховували шляхом порівняння результатів TSO Comprehensive (ЄС) qPCR-аналізів для пропуску екзона 14 EGFRvIII і MET, включаючи одну відому позитивну РНК для кожного з варіантів сплайсингу. Аналіз узгодженості проводили на 230 унікальних зразках FFPE РНК 14 типів тканин з доступними даними як за допомогою методу TSO Comprehensive (ЄС), так і за допомогою еталонного методу. Усі зразки аналізували на пропускання 14-го екзона MET, тоді як аналіз на EGFRvIII проводили тільки в тканинах головного мозку відповідно. Три зразки, які називаються позитивними для пропуску екзона 14 MET методом qPCR, але не TSO Comprehensive (ЄС) мали середній $St > 37$ і були нижче рівня TSO Comprehensive (ЄС) LoD. Нижче (Таблиця 79) підсумовані результати дослідження узгодженості.

Таблиця 79 Короткий огляд аналізу узгодженості між TSO Comprehensive (ЄС) та qPCR-аналізом для варіантів сплайсингу РНК

Варіанти сплайсингу РНК	qPCR позитивний	qPCR-негативний
TSO Comprehensive (ЄС) Позитивні (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (ЄС) Негативні (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (ЄС) Позитивні (MET пропуск екзона 14)	1	0
TSO Comprehensive (ЄС) Негативні (MET пропуск екзона 14)	3	217

Варіанти сплайсингу РНК	qPCR позитивний	qPCR-негативний
Загалом	7	230
Відсоток угодженості	PPA: 57 % (4/7) 95%-й ДІ: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95%-й ДІ: [98 %, 100 %]

Виявлення злиття РНК

Порівняння з комбінованим методом

Злиття TSO Comprehensive (ЄС) порівнювали з комбінованим методом, що складається з секвенування цілого екзому РНК із застосуванням панелі NGS (RNGS1), цільової панелі злиття NGS (RNGS2) і цифрової ПЛР крапельного методу (ddPCR).

Метод RNGS1 охоплює усі гени, для яких TSO Comprehensive (ЄС) можна виявити злиття. Однак межа виявлення методу RNGS1 становила 4X–8X від межі TSO Comprehensive (ЄС) на основі кількості підтверджувальних зчитувань, які спостерігаються під час в розпізнаних злиттях, що перекриваються. Таким чином, з використанням методу WES (RNGS1) застосовували комбінований метод із використанням двох додаткових методів із більшою чутливістю, але меншою широтою охоплення для злиттів.

Усього за допомогою RNGS1 було досліджено 255 унікальних зразків РНК, що представляють 14 типів тканин і прохідні TSO Comprehensive (ЄС) показники. Два зразки були недійсними для контролю якості зразка RNGS1 і були виключені з додаткового аналізу. Із 82 злиттів, виявлених TSO Comprehensive (ЄС), 4 були виключені з оцінки через невдалий контроль якості зразка RNGS1, а 7 додаткових не можна було виявити через відсутність цільових послідовностей у панелі RNGS1. З решти 71 злиття, виявленого TSO Comprehensive (ЄС), RNGS1 підтвердила 9 злиттів. RNGS1 виявив 4 злиття, які не виявлені TSO Comprehensive (ЄС).

Із 62 злиттів, які були TSO Comprehensive (ЄС) позитивними та не виявлялися за допомогою RNGS1, 13 перекривали та підтверджували за допомогою RNGS2. Одне злиття було виявлено за допомогою RNGS2, але не виявлено TSO Comprehensive (ЄС).

Потім для злиттів, виявлених за допомогою TSO Comprehensive (ЄС), не виявлених або які не піддаються виявленню RNGS1, та не оцінених RNGS2 (49), використовували крапельну цифрову ПЛР. Крім того, ddPCR використовували для повторної оцінки 2 з 4 хибнонегативних злиттів для TSO Comprehensive (ЄС) з RNGS1 і 2 з 9 узгоджених злиттів для TSO Comprehensive (ЄС) і RNGS1. Для забезпечення специфічності було включено п'ять негативних зразків злиття з аналізом кожного зразка з позитивним результатом. Вісімнадцять злиттів не тестували за допомогою ddPCR через неможливість розробки праймерів/зондів, кількох партнерів генів для злиття або недостатню кількість FFPE матеріалу, що залишився. Для ddPCR праймери та зонди були розроблені відповідно до спостережуваних точок розриву в аналізі TSO Comprehensive (ЄС).

Загалом за допомогою ddPCR було виявлено 52 злиття, 41 з цих злиттів були виявлені за допомогою TSO Comprehensive (ЄС), але не виявлені або їх не можна виявити за допомогою RNGS1. Дев'ять злиттів були виявлені за допомогою ddPCR, але вони були негативними у TSO Comprehensive (ЄС) або RNGS1. Два позитивні злиття ddPCR підтвердили 2 узгоджені злиття для TSO Comprehensive (ЄС) та RNGS1. Для 2 повторно оцінених TSO Comprehensive (ЄС) хибнонегативних результатів з RNGS1 не було виявлено злиття за допомогою ddPCR; однак, вони були враховані як хибнонегативні на основі порівняння RNGS1.

З 255 зразків для дослідження було відібрано 35 зразків, оскільки вони були позитивними щодо злиття з використанням TSO Comprehensive (ЄС) або попередньої моделі аналізу. Ефективність для цих характеризованих зразків коригували із застосуванням середньої поширеності злиття. У комбінованих функціональних характеристиках для охарактеризованих і неохарактеризованих зразків використовували незмінне середньозважене значення. Зведені результати узгодженості для злиттів показані як [Таблиця 80](#).

66 злиттів (54 унікальні злиття), що узгоджуються з комбінованим методом, представляли 43 гени в панелі TSO Comprehensive (ЄС). Однак, випадки злиття можуть бути зареєстровані лише з 23 генів, зазначених нижче ([Таблиця 80](#)).

Таблиця 80 Короткий огляд відповідності для злиття РНК

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

* Довірчий інтервал, розрахований за допомогою бутстрепу.

Порівняння з методом FISH для злиттів ROS1 та ALK

Двадцять п'ять зразків НДКРЛ було досліджено методом FISH для злиття ROS1 та ALK, та 5 додаткових зразків НДКРЛ було досліджено на предмет злиття ROS1 відповідно. Вісім зразків не пройшли FISH-тест на ROS1 через недостатню кількість тканини. Було виявлено два злиття ROS1 і одне злиття ALK за допомогою TSO Comprehensive (ЄС) і FISH. Суперечливих результатів не спостерігалось. Нижче ([Таблиця 81](#)) підсумовано результати узгодженості TSO Comprehensive (ЄС) та методу FISH для злиттів ROS1 та ALK.

Таблиця 81 Короткий огляд результатів відповідності TSO Comprehensive (ЄС) та методу FISH для злиттів ROS1 та ALK

ALK+ROS1	FISH Позитивний	FISH Негативний
TSO Comprehensive (ЄС) Позитивні	3	0
TSO Comprehensive (ЄС) Негативні	0	44
Загалом	3	44
Відсоток збігу	PPA: 100% (3/3) 95%-й ДІ: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95%-й ДІ: [92%, 100%]

Валідність зразків

Валідність зразків (перша спроба) вимірювали для 181 унікального зразка РНК і 272 унікальних зразків ДНК із FFPE блоків ≤ 5 років. Ці зразки були відібрані на основі типу тканини та наявного матеріалу; валідність аналізу була невідомою. Для того, щоб тип варіанта вважався дійсним, параметри контролю якості бібліотеки мають пройти повні межі. Валідність зразків оцінювали окремо для кожного з типів

варіантів (малі варіанти ДНК/TMB, MSI, ампліфікації генів, злиття/сплайсинг) і показано як [Таблиця 82](#). Додаткове зниження валідності MSI на 1 % для FFPE блоків віком ≤ 2 років внаслідок транспортування реагентів прогнозується.

Таблиця 82 Валідність зразків

Тип варіанта	Валідність зразків
Злиття/варіанти сплайсингу (PHK)	76 %
Малі варіанти ДНК/TMB	75 %
MSI	72 %
Ампліфікація гена	94 %

Короткий огляд аналітичної валідації за заявленими показниками профілювання пухлини

На основі даних межі виявлення, точності, відтворюваності та точності TSO Comprehensive (ЄС) аналітично валідовано для таких показників:

- Малі варіанти ДНК — SNV, MNV, інсерції та делеції.
- TMB
- MSI
- Ампліфікація генів MET і ERBB2 (HER2) ([Таблиця 2](#)).
- 23 гени, для яких можна виявити злиття ([Таблиця 2](#)).
- Варіанти сплайсингу EGFR і MET ([Таблиця 2](#)).

Клінічна ефективність NTRK

Щоб підтвердити аналіз TSO Comprehensive (ЄС) як супутню діагностику (CDx) для відбору пацієнтів для лікування препаратом VITRAKVI (ларотректиніб), зразки пацієнтів, включених у клінічні дослідження ларотректинібу (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, які разом називаються зразками дослідження ларотректинібу) з використанням даних, отриманих станом на 15 липня 2019 р., доповнених зразками тканини FFPE, отриманої комерційно, були протестовані на підтримку дослідження точності аналізу TSO Comprehensive (ЄС) та клінічного допоміжного дослідження.

NCT02122913 було багатоцентровим, відкритим дослідженням фази 1 з підвищенням дози у дорослих пацієнтів із поширеними солідними пухлинами (усіх пацієнтів), без відбору за критерієм раку, позитивного щодо злиття NTRK. Після частини дослідження з підвищенням дози було розпочато збільшення дози для пацієнтів із задокументованим раком, позитивним щодо злиття NTRK, і для пацієнтів, які, на думку дослідника, можуть отримати користь від високоселективного інгібітора TRK. NAVIGATE NCT02576431 — це поточне, багатоцентрове, відкрите дослідження фази 2 з комплексною

терапією у пацієнтів віком від 12 років із рецидивуючими поширеними солідними пухлинами з задокументованим злиттям NTRK за оцінкою зовнішньої лабораторії. SCOUT NCT02637687 — це поточне, багатоцентрове, відкрите дослідження фази 1/2 у педіатричних пацієнтів віком від народження до 21 року з поширеними солідними пухлинами або пухлинами первинної центральної нервової системи (ЦНС).

З пацієнтів з позитивним результатом злиття NTRK, включених у дослідження аналізу TSO Comprehensive (ЄС), 164 сформували розширену первинну вибірку для оцінки ефективності (ePAS4).

Дослідження точності для виявлення злиттів NTRK1, NTRK2, NTRK3

Точність аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для виявлення злиттів NTRK (NTRK1, NTRK2 або NTRK3) у пацієнтів із солідними пухлинами була продемонстрована шляхом оцінки узгодженості результатів злиття NTRK між аналізом TSO Comprehensive (ЄС) і валідованим ортогональним методом на основі NGS.

Було проведено ретроспективне неінтервенційне дослідження. Зразки, отримані в ході дослідження лоротрекстіну, та додаткові зразки були проаналізовані за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) в одному зовнішньому центрі та з ортогональним методом у центральній лабораторії. Точність розпізнавання злиттів NTRK для аналізу TSO Comprehensive (ЄС) оцінювалася відносно ортогонального методу; збіг позитивних результатів (PPA), збіг негативних результатів (NPA) і відповідні двосторонні 95% довірчі інтервали (ДІ) розраховувалися.

Було проаналізовано 516 зразків за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС) та/або ортогонального методу. З цих зразків 499 було проаналізовано обома методами. Сімнадцять із 516 зразків не були проаналізовані за допомогою одного з аналізів через невдале екстрагування, невідому причину (для ортогонального методу) або відхилення від протоколу. З 499 зразків, проаналізованих обома методами, 170 (34,1 %) були зразками, дослідженими із застосуванням ларотрекстіну, а 329 (65,9 %) були додатковими зразками.

Перехресна табуляція результатів для 499 зразків показана як [Таблиця 83](#). З 499 зразків 85 мали недійсні результати аналізу TSO Comprehensive (ЄС); з цих 85, 53 зразків також мали недійсні результати ортогонального методу. Додаткові сім зразків мали недійсні результати ортогонального методу. Таким чином, 407 із 499 зразків мали дійсні результати за обома методами.

Таблиця 83 Дослідження точності NTRK. Перехресна табуляція TSO Comprehensive (ЄС) результату порівняно з результатом ортогонального методу для виявлення злиття NTRK

Результат аналізу TSO Comprehensive (ЄС)	Результат ортогонального методу			
	Позитивне злиття NTRK	Негативне злиття NTRK	Недійсний	Загалом
Позитивне злиття NTRK	114	16	1	131
Негативне злиття NTRK	4	273	6	283
Недійсні*	4	28	53	85
Загалом	122	317	60	499

* Недійсні результати аналізу TSO Comprehensive (ЄС) походять зі зразка та рівня прогону.

Аналізи узгодженості, за винятком недійсних результатів аналізу TSO Comprehensive (ЄС), наведені в Таблиця 84. За винятком недійсних результатів аналізу TSO Comprehensive (ЄС), PPA становила 96,6 % (114/118; 95 % ДІ: 91,5–99,1 %), а NPA — 94,5 % (273/289; 95 % ДІ: 91,2–96,8 %).

Таблиця 84 Дослідження точності NTRK: PPA та NPA аналізу TSO Comprehensive (ЄС) порівняно з результатами ортогонального методу для виявлення злиття NTRK

Заходи узгодженості	За винятком недійсних результатів аналізу TSO Comprehensive (ЄС)		Включно з недійсними результатами аналізу TSO Comprehensive (ЄС)	
	Узгодженість, % (н/н)	95%-й ДІ*	Узгодженість, % (н/н)	95%-й ДІ*
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% ДІ на основі (точного) методу Клоппера-Пірсона.

Клінічне допоміжне дослідження для виявлення злиття NTRK1, NTRK2, NTRK3

Клінічна валідність аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для виявлення злиттів NTRK1, NTRK2 або NTRK3 у пацієнтів із солідними пухлинами, які можуть отримати користь від лікування ларотректинібом, була продемонстрована в клінічному допоміжному дослідженні. Дослідження проводилося для оцінки клінічної ефективності аналізу TSO Comprehensive (ЄС) з метою ідентифікації пацієнтів із позитивним результатом злиттів NTRK1, NTRK2 або NTRK3 для лікування ларотректинібом, а також для оцінки узгодженості між методами аналізу TSO Comprehensive (ЄС) та методами локального аналізу (LT) (використовується для визначення статусу злиття NTRK для клінічних досліджень ларотректинібу).

Методи LT включали NGS, флуоресцентну гібридизацію in situ (FISH), полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) та аналізи NanoString. Злиття NTRK (ETV6 NTRK3) було зроблено для пацієнтів з дитячою фібросаркомою, які мали задокументовану транслокацію ETV6, виявлену за допомогою FISH. Більшість із 235 пацієнтів, які брали участь у дослідженні ларотректинібу з відомим статусом злиття NTRK, були протестовані методами NGS.

Станом на дату припинення збору даних 15 липня 2019 р. було включено 279 пацієнтів. З 279 пацієнтів 208 були позитивними щодо злиття NTRK. Із 208 позитивних пацієнтів у 164 утворилися ePAS4 ларотректинібу.

Первинною кінцевою точкою для аналізу ефективності ларотректинібу була загальна частота відповіді (ЗЧВ) за оцінкою незалежного наглядового комітету (IRC) в об'єднаному наборі даних трьох клінічних досліджень. ЗЧВ оцінювали на основі частки пацієнтів із найкращою загальною відповіддю — підтвердженою повною відповіддю або підтвердженою частковою відповіддю на основі критеріїв RECIST версії 1.1. ЗЧВ у дослідженні ePAS4 ларотректинібу становила 72,6 % (95 % ДІ [65,1 %, 79,2 %]) і включала пацієнтів із 16 різними типами пухлин.

Звіт щодо зразків

Набір зразків включав представлення широкого спектру типів пухлин та зразків пацієнтів дитячого та дорослого віку.

Станом на 15 липня 2019 р. у дослідження ларотрекстинібу було включено 279 пацієнтів. З них у 235 пацієнтів був відомий статус злиття NTRK, як визначено методом LT: у 208 пацієнтів був позитивний результат і у 27 пацієнтів був негативний результат. Для 44 пацієнтів статус злиття NTRK був невідомим, оскільки тестування не вимагалось для відповідності пацієнта критеріям участі у фазах підвищення дози у дослідженнях NCT02122913 та SCOUT NCT02637687. Для клінічного допоміжного дослідження аналізу TSO Comprehensive (ЄС) зразки пацієнтів, які брали участь у дослідженні ларотрекстинібу станом на 15 липня 2019 р. з відомим статусом злиття NTRK (208 позитивних пацієнтів і 27 негативних пацієнтів), а також додаткові зразки, визначені як такі, що мають негативний результат злиття NTRK за репрезентативними методами LT, відповідали критеріям участі в цьому дослідженні.

З 208 зразків, позитивних на ларотрекстиніб, 154 мали зразок для аналізу TSO Comprehensive (ЄС). З них 138 мали дійсні результати. П'ятнадцять зразків були недійсними через невідповідність показникам якості секвенування зразків і 1 зразок не був протестований через відхилення від протоколу. З 27 негативних зразків, отриманих у дослідженні ларотрекстинібу, 24 зразки були доступні для аналізу. З них 22 мали дійсні результати аналізу TSO Comprehensive (ЄС). Два зразки були недійсними через невідповідність показникам якості секвенування зразків.

Додаткові зразки піддавали скринінгу за допомогою одного з двох репрезентативних методів LT. Було отримано більше 350 зразків, які досліджували на предмет вмісту пухлини. З додаткових зразків, що відповідають вимогам до зразків, 266 були успішно видалені та підтверджені репрезентативним методом LT як негативні щодо злиття NTRK. З цих зразків 260 були доступні для аналізу TSO Comprehensive (ЄС), з яких 222 мали дійсні результати. Було 38 зразків, які були недійсними через невідповідність показникам секвенування зразків ($n = 25$) або невдале секвенування прогону ($n = 13$). Набір загальних негативних злиттів NTRK складався з 222 додаткових зразків і 22 зразків для дослідження ларотрекстинібу.

Результати узгодженості

Загалом було досліджено 437 зразків за допомогою TSO Comprehensive (ЄС). Серед 208 пацієнтів з позитивним результатом злиття NTRK було 153 пацієнти, які мали доступні зразки та були протестовані за допомогою TSO Comprehensive (ЄС), що дало 138 дійсних результатів і 15 недійсних результатів.

Узгодженість результатів TSO Comprehensive (ЄС) щодо результатів, отриманих за допомогою методів LT, з недійсними результатами TSO Comprehensive (ЄС) та без них, наведено нижче ([Таблиця 85](#)).

Таблиця 85 Додаткове клінічне дослідження NTRK. Узгодженість між аналізами TSO Comprehensive (ЄС) та методами LT для виявлення злиття NTRK

Заходи узгодженості	За винятком недійсних результатів TSO Comprehensive (ЄС) аналізу		Включаючи недійсні результати аналізу TSO Comprehensive (ЄС)	
	% узгодженості (кількість/кількість)	95%-й ДІ*	% узгодженості (кількість/кількість)	95%-й ДІ*
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

* Двосторонні 95% ДІ розраховували з використанням (точного) методу Клопера-Пірсона.

Аналіз чутливості проти відсутніх результатів аналізу TSO Comprehensive (ЄС) продемонстрував надійність аналізу узгодженості. Відсутні результати аналізу TSO Comprehensive (ЄС) для пацієнтів із позитивним результатом злиття LT NTRK (n = 70) були підставлені за допомогою моделі логістичної регресії. Оцінки узгодженості, включно з підставленими значеннями, наведені як [Таблиця 86](#).

Таблиця 86 Клінічне допоміжне дослідження NTRK. Узгодженість між методами кількісного аналізу TSO Comprehensive (ЄС) та LT для виявлення злиття NTRK, включаючи введені значення для LT позитивних пацієнтів із відсутніми результатами аналізу TSO Comprehensive (ЄС)

Заходи узгодженості	Статистика %	95%-й ДІ*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Відсутні результати комплексного аналізу TSO (ЄС) для пацієнтів із негативним результатом злиття LT не підставлятимуться.

* Двосторонні 95% ДІ розраховували на основі методу множинних підстановок. Метод множинних підстановок — це етап бутстрепа, який включений у множинну підстановку (Schomaker і Neumann 2018).

Співпадіння між аналізом TSO Comprehensive (ЄС) і LT за типом методу (наприклад, RNA NGS, FISH) показані в [Таблиця 87](#).

Таблиця 87 Клінічне допоміжне дослідження NTRK: Узгодженість між аналізами TSO Comprehensive (ЄС) та методами LT для виявлення злиття NTRK за типом методу LT

Тип методу LT	Заходи узгодженості	% узгодженості (кількість/кількість)	95 % ДІ¹
ДНК 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)

Тип методу LT	Заходи узгодженості	% узгодженості (кількість/кількість)	95 % ДІ ¹
PHK NGS ²	PPA	91,5 (75/82)	(83,2, 96,5)
	NPA	96,9 (218/225)	(93,7, 98,7)
	OPA	95,4 (293/307)	(92,5, 97,5)
FISH	PPA	80,0 (8/10)	(44,4, 97,5)
	NPA	Не розраховано (1/1)	Не розраховано
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Не розраховано (0/0)	Не розраховано
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Не розраховано: для підгруп із кількістю зразків < 5 статистичні дані щодо узгодженості не розраховувалися.

¹ Двосторонні 95% ДІ розраховували з використанням (точного) методу Клоппера-Пірсона.

² Включає методи NGS, які використовують лише PHK і як ДНК, так і РНК.

З 437 зразків, досліджених за допомогою аналізу TSO Comprehensive (ЄС), 24 мали невідповідні результати для LT: 15 були позитивними для LT та негативними для аналізу TSO Comprehensive (ЄС), а 9 були негативними для LT та позитивними для аналізу TSO Comprehensive (ЄС). З 24 зразків з невідповідними результатами 8 аналізували за допомогою методу DNA NGS LT, 14 аналізували за допомогою методу RNA NGS LT і 2 аналізували за допомогою FISH.

Затверджений незалежний метод NGS підтвердив результати аналізу TSO Comprehensive (ЄС) в 14 з 24 зразків з неузгодженими результатами. Для решти 10 зразків результати аналізу TSO Comprehensive (ЄС) не відповідали як методу ЗЖ, так і незалежному NGS.

Результати оцінки клінічної ефективності

У межах когорти ePAS4 ефективність ларотрекстинібу в популяції з TSO Comprehensive (ЄС) позитивним результатом, позитивним на LT (97 пацієнтів, ЗЧВ = 78,4%, 95% ДІ [68,8%, 86,1%]) була подібною до ефективності ларотрекстинібу в загальній популяції ePAS4 (164 пацієнти, ЧОВ = 72,6%, 95% ДІ [65,1%, 79,2%]) (Таблиця 88). З 97 TSO Comprehensive (ЄС) позитивних пацієнтів в ePAS4 28 (28,9%) пацієнтів досягли повної відповіді/повної хірургічної відповіді, а 48 (49,5%) пацієнтів досягли часткової відповіді.

З 13 TSO Comprehensive (ЄС) негативних, LT-позитивних популяцій у 1 (7,7 %) спостерігалася повна відповідь, а у 2 (15,4 %) була часткова відповідь на терапію ларотрекстинібом.

Таблиця 88 Клінічне допоміжне дослідження NTRK: ЧОВ для пацієнтів з позитивним результатом LT, за LT, та результатами TSO Comprehensive (ЄС) ePAS4

		Злиття LT Позитивний N = 164	TSO Comprehensive (ЄС) Позитивний та LT позитивний N = 97	TSO Comprehensive (ЄС) Негативний та LT позитивний N = 13
Найкраща загальна відповідь, n (%)	Повна відповідь	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Хірургічна повна відповідь	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Часткова відповідь	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Стабілізація захворювання	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Прогресування захворювання	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Не оцінюваний	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Загальний рівень відповідей	Кількість пацієнтів, n	164	97	13
	Кількість пацієнтів з ПВ + хПВ + ЧВ, n	119	76	3
	ЗЧВ% (95% ДІ*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Скорочення: ПВ = повна відповідь, ЧВ = часткова відповідь, хПВ = хірургічна повна відповідь.

* Двосторонній 95% довірчий інтервал розраховували з використанням (точного) методу Клоппера-Пірсона.

У 54 пацієнтів відсутні результати комплексного аналізу TSO (ЄС).

Дані цього дослідження підтверджують безпечність та ефективність аналізу TSO Comprehensive (ЄС) при використанні для ідентифікації пацієнтів із солідними пухлинами з злиттям NTRK, які можуть відповідати критеріям для лікування лароректинібом.

Використана література

1. Американське товариство клінічної онкології. www.asco.org. Доступ надано 3 жовтня 2016 р.
2. Європейське товариство медичної онкології. www.esmo.org. Доступ надано 3 жовтня 2016 р.

Історія редакцій

Редакція	Дата	Опис зміни
Документ № 200007789, вер. 08	Травень 2025 р.	Видалено посилання на версії програмного забезпечення та номери частин. Оновлені обмеження процедури: • Інформація про некротичну тканину. • Інформація про вміст пухлини MSI. Оновлено: • Примітка NTC застосовується як до бібліотек min, так і до бібліотек max. • У розділі «Обладнання та матеріали» перераховано технічні характеристики центрифуги з планшетом та значення піпетки. • Розрахунок охоплення SPB від 1,05x до 1,15x. • Термінологія для пропуску екзона 14 MET до екзона 14 MET. Додано: • Примітка для SMB у «Захопленні цілей один і два» • Підготовка до початку секвенування. • Додаткова інформація про про ультразвуковий апарат. Додано уточнення та оновлено результати щодо функціональних характеристик: • Інтерферентні речовини. • Точність профілювання пухлини та валідність зразка. • Межа виявлення дослідження 1 і 2. • Дослідження внутрішньолабораторної точності 1. • Дослідження відтворюваності 2. • Стабільність бібліотеки та інформація про зберігання бібліотеки. • Межа холостої проби. Оновлено мову та граматику.

Редакція	Дата	Опис зміни
Документ № 200007789, вер. 07	Січень 2024 р.	- До розділу «Обмеження процедури» додано інформацію: - Вимоги до зразків некротичних тканин та пухлинного вмісту для MCH-high і соматичних драйверних мутацій. - Потенційна взаємодія з гемоглобіном. - Межі виявлення в гені RET і розпізнавання злиттів поза межами анотаційного гена. - Делеції генів не повідомляються. - Оновлено для використання з програмним забезпеченням TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager версії 2.3.7. - Додано інформацію про необхідне, але не надане обладнання та матеріали, включаючи дві додаткові конфігурації ультразвукових апаратів. - Оновлена інформація про зразок та його склад: - Вміст некротичних тканин. - Вплив протеїнази K та гемоглобіну. - Зберігання FFPE, закріпленого на слайді, та очищеної нуклеїнової кислоти. - Додано інформацію для покращення обробки реагентів, робочого процесу та усунення несправностей під час прогону помилок контролю якості. - Додано контекст і чіткість до робочих характеристик: - Перехресне забруднення - Оцінка набору для екстрагування з нуклеїновою кислотою - Інтерферентні речовини - Стабільність FFPE у вигляді нуклеїнової кислоти та предметного скельця - Клінічна ефективність NTRK - Оновлена мова та граматика
Документ № 200007789, вер. 06	Лютий 2023 р.	- Додаткові твердження в розділі «Обмеження» - Оновлення мови для покращення домовленостей, граматики та ясності - Виправлення таблиць 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 - Заява про наявність осаду в реагенті FSM - Оновлено характеристики термоциклера та жолоба в списку Обладнання та матеріалів.
Документ № 200007789 вер. 05	Вересень 2022 р.	Оновлені таблиці відтворюваності дослідження 2

Редакція	Дата	Опис зміни
Документ № 200007789, вер. 04	Червень 2022 р.	- Додано модуль комплексного аналізу TSO версії 2.3.5 PN - Видалено модуль комплексного аналізу TSO версії 2.3.3 PN - Оновлено термінологію в розділі «Межа холостої проби»
Документ № 200007789, вер. 03	Квітень 2022 р.	- Додано інформацію про характеристики ефективності, пов'язані зли злиттям NTRK - Додано ТІЛЬКИ ДЛЯ ЕКСПОРТУ - Оновлено заяву про цільове використання з метою додавання вимоги щодо CDx NTRK1-3 - Розширена інформація про компоненти продукту для включення програмних компонентів
Документ № 200007789, вер. 02	Лютий 2022 р.	- Виправлена довідкова помилка таблиці - Додано обмеження, пов'язані з гермінальними та соматичними варіантами - Уточнено формулювання щодо виявлення ампліфікації гена
Документ № 200007789, вер. 01	Грудень 2021 р.	- Оновлено обмеження процедури - Уточнено технічні характеристики магнітної стійки та термоциклера в переліку обладнання та матеріалів.
Документ № 200007789, вер. 00	Листопад 2021 р.	Початкова редакція

Патенти й товарні знаки

Цей документ і його вміст є власністю компанії Illumina, Inc. та її філій (надалі — Illumina). Він призначений лише для того, щоб користувач використовував вироби тільки за угодою в цілях, описаних у цьому документі. Цей документ і його вміст не слід використовувати або поширювати з будь-якою іншою метою та/або для іншого обговорення, розкриття або відтворення тим або іншим чином без попередньої письмової згоди компанії Illumina. Цим документом компанія Illumina не надає жодного дозволу на свій патент, товарний знак, авторське право або загальноприйняті права, а також на подібні права будь-яких третіх сторін.

Щоб гарантувати правильне та безпечне використання виробів, описаних у цьому документі, кваліфікований і належним чином навчений персонал повинен суворо та чітко дотримуватись інструкцій, описаних у цьому документі. Перед використанням цих виробів потрібно повністю прочитати й зрозуміти весь вміст цього документа.

НЕПОВНЕ ВИВЧЕННЯ ВСІХ ЗАЗНАЧЕНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ ВКАЗІВОК І ЇХ НЕЧІТКЕ ДОТРИМАННЯ МОЖЕ ПРИЗВОДИТИ ДО ПОШКОДЖЕННЯ ЦИХ ВИРОБІВ, ТРАВМУВАННЯ ЛЮДЕЙ, ЗОКРЕМА КОРИСТУВАЧІВ АБО ІНШИХ ОСІБ, І ДО ПОШКОДЖЕННЯ ІНШОЇ ВЛАСНОСТІ, А ТАКОЖ ПРИЗВЕДЕ ДО ВТРАТИ БУДЬ-ЯКИХ ГАРАНТІЙНИХ ЗОБОВ'ЯЗАНЬ, ЗАСТОСОВНИХ ДО ЦИХ ВИРОБІВ.

КОМПАНІЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕ ЖОДНОЇ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ, ЩО ВИНΙΚАЄ ВНАСЛІДОК НЕНАЛЕЖНОГО ВИКОРИСТАННЯ ВИРОБІВ, ОПИСАНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ (ВКЛЮЧНО З ЙОГО ЧАСТИНАМИ АБО ПРОГРАМНИМ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯМ).

© 2025 Illumina, Inc. Усі права застережено.

Усі товарні знаки є власністю компанії Illumina, Inc. або їхніх відповідних власників. Конкретну інформацію про товарні знаки зазначено на сторінці www.illumina.com/company/legal.html.

Контактна інформація



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A. (США)
+1 800 809.ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (за межами Північної Америки)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE

IVD



Маркування виробу

Повний список символів, які може бути зображено на пакуванні або маркуванні виробу, див. у поясненні символів на вебсайті support.illumina.com у вкладці *Documentation* (Документи) для вашого набору.