

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Pakkausseloste

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN. VAIN VIENTIIN.

Suunniteltu käyttötarkoitus

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) on *in vitro* -diagnostinen testi, jossa hyödynnetään uuden sukupolven kohdistettua sekvensointia 517 geenin varianttien tunnistamiseksi käyttämällä nukleiinihappoja, jotka on uutettu formaliinifiksoiduista, parafiinivaletuista (FFPE) kasvaimen kudoksenäytteistä, jotka on otettu syöpäpotilailta, joilla on kiinteitä pahanlaatuisia kasvaimia. Sekvensointi tehdään Illumina® NextSeq™ 550Dx -laitteella. Testin avulla voidaan tunnistaa yksittäisen nukleotidin variantteja, monen nukleotidin variantteja, insertioita, deleetioita ja geenin monistumisia DNA:sta sekä geenifuusioita ja liitosvariantteja RNA:sta. Testi raportoi lisäksi kasvaimen mutaatiokuorman (TMB) pisteet ja mikrosatelliitti-instabiiliuden (MSI) tilan.

Testi on tarkoitettu lääkehoidon ja diagnostiikan yhdistäväksi ohjelmaksi, jonka avulla tunnistetaan syöpäpotilaat, jotka soveltuvat taulukossa [Taulukko 1](#) luetelluilla kohdennetuilla hoidoilla hoidettaviksi hyväksytyin hoitotuotteen merkinnän mukaan. Lisäksi testillä voidaan tuottaa kasvaimen profiointitietoa päteville terveydenhuollon ammattilaisille ammatillisen ohjeistuksen mukaisesti. Testi ei anna lopullisia tuloksia, eikä se ohjaa minkään tietyn hoitotuotteen myyntiluvan mukaiseen käyttöön.

Taulukko 1 Kytkö diagnostiikan käyttöaihe

Kasvaimen tyyppi	Biomarkkerit	Kohdennettu hoito
Kiinteät kasvaimet	NTRK1-, NTRK2- ja NTRK3- geenifuusiot	VITRAKVI® (larotrekiniibi)

Määrityksen yhteenveto ja selitys

Kliininen kuvaus

Syöpä on maailmanlaajuisesti yksi yleisimmistä kuolinsyistä, ja se voi saada alkunsa mistä tahansa kudoksesta.^{1,2} Syövän geneettisen perustan analysointi on tärkeää tunnistettaessa potilaita, jotka voivat hyötyä kohdennetuista hoidoista, ja kehitettäessä uusia hoitomenetelmiä. Useilla geneeillä on osoitettu olevan yhteyttä syövän syntyyn ja etenemiseen, ja monissa syövässä on useita variantteja, jotka vaikuttavat näihin geneihin ja niiden tehtäviin. Näihin variantteihin voi sisältyä geenimutaatioita, kuten yhden nukleotidin variantteja (SNV:t), monen nukleotidin variantteja (MNV:t), insertioita tai deleetioita, geenimonistumia, geenifuusioita ja liitosvariantteja. Toinen syövän geenimutaatioiden seuraus on neoantigeenien esiintyminen. Ne voivat aiheuttaa syöpäkohtaisia immuunivasteita. Syövän mutaatiotila voidaan esittää TMB:n ja MSI:n mukaan, jotka ovat genomien epävakauten ja syövän neoantigeenien esiintymiseen liittyviä genomisia tunnusmerkkejä.

TruSight Oncology Comprehensive on kvalitatiivinen uuden sukupolven sekvensointia (NGS) ja laajaa genomiprofilointia (CGP) hyödyntävä testi, joka arvioi laajasti genomivariantteja [Taulukko 2](#) esitettyjen, syöpään liittyvien geenien suuressa paneelissa. Määritys havaitsee pienet variantit 517 geenissä sekä geenin monistumiset, fuusiot ja liitosvariantit, jotka esitetään [Taulukko 2](#). Määritys sisältää koodaussekvenssikattavuuden kaikille geneille lukuun ottamatta TERT:tä, jonka osalta vain promoottorialue katetaan, ja TMB-pisteiden ja MSI-tilan määrittämisen. Näiden määrityskohteiden sisältöön viitataan ammatillisten organisaatioiden laatimissa hoito-ohjeissa ja muissa merkittävässä yhdysvaltalaisissa hoito-ohjeissa. Riippumattomat konsortiojulkaisut ja myöhäisen vaiheen lääketutkimukset vaikuttivat myös TSO Comprehensive -määrityksen suunnitteluun.

Varianttittunnistuksen ulkopuolelle jätetyt alueet luetellaan *TruSight Oncology Comprehensive Block List (asiakirjanumero 200009524)* -estoluettelossa, joka on saatavilla [Illumina -tukisivustolta](#).

[Taulukko 2](#) sisältää neljä varianttityyppiluokkaa: pieni DNA-variantti (S), geenin monistuminen (A), fuusio (F) ja silmukointivariantti (Sp). Pieniä DNA-variantteja ovat SNV:t, MNV:t, insertiot ja deleetiot.

Taulukko 2 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen geenipaneeli

Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi
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	PKD1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S

Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3 020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S

Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S

Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi
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	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2 072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRF1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S

Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi	Nro	Entrez-tunnus	Geeni	Varianttityyppi
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	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu	Ei sovellu

Menetelmän periaatteet

TSO Comprehensive (EU) -määritys on jaettu testi, joka suoritetaan manuaalisesti käyttämällä uutettua nukleinihappoa syötemateriaalina. Formaliiniin fiksoidusta ja parafiiniin valetusta (FFPE) kudoksesta uutettua DNA:ta ja/tai RNA:ta käytetään sellaisten kirjastojen valmisteluun, jotka rikastetaan sen jälkeen syöpään liittyvien geenien suhteen ja sekvensoidaan NextSeq 550Dx -laitteella.

TSO Comprehensive (EU) -määritys sisältää seuraavat prosessit.

- **Kirjaston valmistelu ja rikastus** — RNA:n osalta yhteensä 40 ng RNA:ta muunnetaan kaksijuosteiseksi komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). Genomisen DNA:n (gDNA) osalta 40 ng gDNA:ta fragmentoidaan pieniksi fragmenteiksi. Yleiskäyttöiset sekvensointiadapterit yhdistetään ligaatiolla cDNA- ja gDNA-fragmentteihin. P5- ja P7-adapterisekvenssit sisällytetään kuhunkin kirjastoon, jotta kirjastofragmentit voidaan siepata virtauskyvetin pintaan sekvensoinnin aikana. Adaptereihin sisältyy i5- ja i7-sekvenssit kunkin yksittäisen näytteen tunnistamiseksi ja, gDNA-näytteistä peräisin olevien kirjastojen tapauksessa, yksittäisten molekyylien tunnistamiseksi ainutkertaisilla molekyyli-tunnisteilla (UMI). Kirjastot rikastetaan sen jälkeen tiettyjen kohdegeenien osalta sieppaukseen perustuvalla menetelmällä. Kirjastoihin hybridisoidaan biotinyloituja kohdesekvenssejä, jotka sisältävät määrityksen kohdegeenialueita. Koettimet ja hybridisoidut kohdekirjastot eristetään muista kuin kohdekirjastoista sieppaamalla streptavidiinimagneettipartikkeleita käyttäen. Rikastetut kohdekirjastot pestään ja monistetaan. Sen jälkeen kunkin rikastetun kirjaston määrä normalisoidaan helmiin perustuvalla menetelmällä, jotta voidaan varmistaa yhtä suuri edustus poolatuissa kirjastoissa sekvensointia varten.
- **Sekvensointi ja ensisijainen analyysi** — Normalisoidut, rikastetut kirjastot poolataan ja klusteroidaan virtauskyvetiin ja sen jälkeen sekvensoidaan synteetikemialla (SBS) NextSeq 550Dx -laitteessa. SBS-kemiassa käytetään reversiibelin terminaattorin menetelmää fluoresoivasti leimattujen yksittäisten deoksinukleotiditriposfaattiemästen (dNTP) havaitsemiseen, kun niitä lisätään kasvaviin DNA-juosteisiin. Jokaisen sekvensointisyklin aikana nukleinihappoketjuun lisätään yksi dNTP. dNTP-leimaa käytetään polymerisaation terminaattorina. Jokaisen dNTP-lisäyksen jälkeen fluoresoiva väriaine kuvannetaan emäksen tunnistamiseksi, minkä jälkeen se pilkotaan, jotta seuraava nukleotidi voidaan lisätä. Neljä palautuvaa terminaattorisidottua dNTP:tä (A, G, T ja C) ovat läsnä yksittäisinä, erillisinä molekyyleinä. Tämän vuoksi luonnollinen kilpailu minimoi lisäyksen vinoumaa. Ensisijaisen analyysin aikana emästunnistukset tehdään suoraan signaalin voimakkuusmittauksista kunkin sekvensointisyklin yhteydessä, jolloin seurauksena on sekvensointi emäs emäkseltä. Kullekin emäksen tunnistukselle määritetään laatuasteet.
- **Toissijainen analyysi** — Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module sijaitsee NextSeq 550Dx -laitteessa osana Local Run Manager -ohjelmistoa TSO Comprehensive (EU) -ajon määrittämisen ja sekvensointitulosten toissijaisen analyysin suorittamisen helpottamiseksi. Toissijaiseen analyysiin sisältyy ajon käsittelyn ja laaduntarkistuksen validointi, jota seuraa demultipleksointi, FASTQ-tiedostojen luonti, kohdistus ja varianttien tunnistus. Demultipleksointi erottaa poolatut kirjastot sellaisten ainutkertaisien sekvenssi-indeksien perusteella, jotka lisättiin kirjaston valmistelutoimenpiteen aikana. Luodaan FASTQ-välitiedostot, jotka sisältävät kunkin näytteen sekvensointireadeja sekä laatupesteytykset ottamatta lukuun readeja klustereista, jotka eivät läpäisseet suodatinta. Sen jälkeen sekvensointireadit

kohdistetaan referenssigenomiin, jotta voidaan tunnistaa sekvenssien välinen suhde ja määrittää pistemäärä samankaltaisten alueiden perusteella. Kohdistetut readit kirjoitetaan tiedostoihin BAM-muodossa. Määrittämisohjelmistossa käytetään erillisiä algoritmeja DNA- ja/tai RNA-näytteistä luoduille kirjastoille DNA:n pienten varianttien, geenin monistumisten, TMB:n ja DNA-näytteiden MSI:n sekä fuusioiden ja RNA-näytteiden silmukointivarianttien tunnistamiseksi. Analyysiohjelmiston moduuli luo useita tuotoksia, muun muassa sekvensoinnin mittaustiedot ja varianttien tunnistusmuototiedostot (VCF). VCF-tiedostot sisältävät tietoa viitegenomin tietyistä asemista löytyneistä varianteista. Sekvensoinnin mittaustiedot ja yksittäiset tuotostiedostot luodaan kullekin näytteelle. Katso toissijaisen ja tertiäärisen analyysin lisätietoja kohdasta *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)*.

- **Tertiäärinen analyysi** — Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -analyysimoduulilla tehtävä tertiäärinen analyysi sisältää TMB- ja MSI-laskelmat, kytkö diagnostiikan tunnistuksen ja kasvainvarianttien profiloinnin kahdella kliinisen merkitsevyyden tasolla käyttäen tietokantaa (KB) ja kudostyyppiä sekä tulosraporttien luomisen. Kasvaimen profilointiin voidaan myös viitata laajana genomiprofilointina. Tulkitut varianttitulokset sekä TMB- ja MSI-biomarkeritulokset esitetään yhteenvetona TSO Comprehensive (EU) -tulosraportissa.

Menetelmän rajoitukset

Vain *in vitro* -diagnostiseen käyttöön.

- Käytettäväksi vain lääkärin määräyksestä. Testiä on käytettävä kliinisten laboratoriomääräysten mukaisesti.
- Käyttötarkoitusta koskevassa [Taulukko 2](#) luetellut genomilöydökset eivät ole ohjaavia tai sitovia minkään tietyn hoitotuotteen käyttöaiheen mukaiseen käyttöön.
- TSO Comprehensive (EU) -tulosraportin kohdassa Genomilöydökset, joissa on merkkejä kliinisestä merkittävyydestä (Taso 2) ja Genomilöydökset, joilla on mahdollisesti kliinistä merkitystä (Taso 3), lueteltujen varianttien kohdalla ei ole suoritettu kliinistä validointia.
- Potilaan hoitoa koskevien päätösten täytyy perustua hoitavan lääkärin riippumattomaan lääkinnälliseen harkintaan, jossa otetaan huomioon kaikki potilaan tilaa koskevat sovellettavat tiedot, kuten potilaan ja potilaan suvun historia, lääkärintarkastukset, muista diagnostiikkatesteistä saadut tiedot sekä potilaan mieltymykset kyseisen yhteisön hoitostandardien mukaan.
- FFPE-näytelaadussa esiintyy runsaasti vaihtelua. Näytteet, joille ei käytetty fiksaation vakiotoimenpiteitä, eivät ehkä tuota uutettuja nukleinihappoja, jotka vastaavat määrittämisohjelmistossa vaadittuja (Laadunvalvonta sivulla 79). FFPE-näyteblokit, joita on säilytetty yli viisi vuotta kauemmin, ovat osoittaneet huonompaa validiteettia.
- TSO Comprehensive (EU) -suorituskykyä ei ole arvioitu sellaisilta potilailta saatujen näytteiden kohdalla, joille on tehty elin- tai kudossiirto.
- Suuri määrä nekroottista kudosta ($\geq 23\%$) voi häiritä TSO Comprehensive (EU) -määrittämisohjelmistossa havaita geenin monistumisia ja RNA-fuusioita.

- Somaattisia ajajamutaatioita ei välttämättä havaita luotettavasti, jos kasvainsisältö (mitattuna pinta-alan mukaan) on alle 20 %.
- Mikrosatelliittistabiili (MS-stabiili) -tulos voi olla epäluotettava, jos kasvainsisältö on alle 30 %. Mikrosatelliitti-instabiliteetti korkea (MSI-Korkea) -tulos on oikea kasvaimen sisällöstä riippumatta.
- Kudokseen liittyvä hemoglobiini vähentää MET-liitosvariantteja tukevia readeja.
- Pitkälle uudelleenjärjestäytyneiden genomien kohdalla, joissa on deleetioita ja heterotsygotian menetystä, TSO Comprehensive (EU) -ohjelmisto voi virheellisesti luokitella DNA-näytteen kontaminoituneeksi (CONTAMINATION_SCORE > 3106 ja p-arvo > 0,049).
- Negatiivinen tulos ei sulje pois mutaation läsnäoloa määrittelyn havaitsemisrajan (LoD) alapuolella.
- Pienten DNA-varianttien tunnistuksen herkkyyteen saattavat vaikuttaa seuraavat tekijät:
 - Alhaisen kompleksisuuden genominen konteksti.
 - Variantin kasvava pituus.
- TMB-pisteet saattavat olla epätarkkoja seuraavissa asiayhteyksissä:
 - Kun kasvaimen sisältö saavuttaa tasot, joissa ituradan ja somaattisten varianttien alleelitaajuudet (VAF) lähenevät toisiaan.
 - Julkisissa tietokannoissa aliedustetut väestöryhmät.
- Geenimonistukset ovat ainoat kopiolukuvariantit, jotka TSO Comprehensive (EU) -ohjelmisto raportoi. Määrittely ei raportoi geenien deleetioita.
- TSO Comprehensive (EU) -määrittelyohjelmiston fuusioiden tunnistusalgoritmit eivät välttämättä ota huomioon näyttöä readeista, jotka ulottuvat geenien merkittyjen rajojen ulkopuolelle.
- Fuusioiden tunnistusherkkyyteen saattavat vaikuttaa seuraavat tekijät:
 - Kirjaston vähäinen kompleksisuus, mikä johtaa tukevien readien vähentymiseen, koska määrittelyn työkulussa ilmenee poikkeamia (noudata esimerkiksi sekoitusvaiheita kohdasta [RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely sivulla 43](#)).
 - Kun molemmat katkoskohdat ovat yksittäisessä geenissä.
 - Tapauksissa, joissa on useita fuusioiden katkoskohtia lähellä toisiaan yhden tai useiden parien kohdalla, useat katkoskohdat ja parit saatetaan ilmoittaa yksittäiseksi katkoskohdaksi ja pariksi.
 - Pienet mediaani-inserttikoot. 80 bp:n mediaani-inserttikokoa edellytetään, mutta herkkyys alenee 80–100 bp:n alueella.
 - Vähäinen sekvensointikompleksisuus tai homologinen genominen konteksti fuusioiden katkoskohtien ympäristössä.
- Fusion katkoskohtien ilmeneminen genomialueilla, joilla on päällekkäisiä geenejä, saattaa vaikuttaa fuusioon osallistuvien geenien resoluutioon. Määrittelyssä raportoidaan kaikki geenit puolipisteillä eroteltuna, jos katkoskohdassa on päällekkäin useita geenejä.
- Epäyhtenäinen kattavuus TERT Promoter -alueella saattaa tuottaa Ei tulosta -tuloksen alhaisen syvyyden vuoksi.

- Annotaatio tai KB-virheet saattavat johtaa virheelliseen positiiviseen tai negatiiviseen tulokseen, muun muassa variantin luettelointiin väärällä tasolla (kohdan Genomilöydökset, joissa on merkkejä kliinisestä merkittävyydestä [Taso 2] ja kohdan Genomilöydökset, joilla on mahdollisesti kliinistä merkitystä [Taso 3] välillä), tai raportin merkintätiedot saattavat olla virheelliset. Merkintä- tai KB-virheet eivät vaikuta CDx-tuloksissa ilmoitettuihin variantteihin. Virhe saattaa syntyä seuraavista kolmesta lähteestä:
 - TSO Comprehensive (EU) -variantin annotaatio. Virheaste on 2 448 350 COSMIC v92:stä saadun variantin analyysin perusteella noin 0,0027 %, joten virheen mahdollisuus on pieni.
 - Kuraatioprosessista johtuva KB-virhe.
 - KB-sisällön merkitys muuttuu ajan kuluessa. Raportti heijastaa tietoa aikana, jolloin KB-version kuraatio suoritettiin.
- TSO Comprehensive (EU) on suunniteltu raportoimaan somaattisista varianteista, kun raportoidaan varianteista, joilla on kliinisesti merkittävää näyttöä, tai varianteista, joilla on mahdollisesti kliinistä merkitystä. Ituradan (perityn) variantin raportointi vain kasvaintestinä on mahdollista, mutta ei tarkoituksellista. TSO Comprehensive (EU) käyttää KB:tä varianttien ilmoittamiseen ilman, että ilmoitetaan nimenomaisesti, ovatko ne peräisin ituradan vai somaattisesta lähteestä.
- Pelkkä KB sisältää terapeuttisia, diagnostisia ja prognostisia assosiaatioita, joilla on merkitystä esiintyvien varianttien kannalta osoitetun kiinteän pahanlaatuisen kasvaimen sisällä. Alttiutta tai syöpäriskiä liittymistä ei ole sisällytetty KB:hen.
- Seuraavassa taulukossa esitetään nukleotidimuutokset kolmen RET-variantin osalta, joita määrittäminen ei pysty havaitsemaan. Saman aminohappomuutoksen yhteydessä voidaan havaita muitakin nukleotidimuutoksia.

Taulukko 3 Nukleotidimuutokset kolmen RET-variantin osalta

Aminohappomuutos	Chr*	Sijainti	Viitealleeli	Vaihtoehtoinen
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

* Chr = kromosomi

Tuotteen osat

TSO Comprehensive (EU) -testi koostuu seuraavista komponenteista:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) -sarja (Illumina-luettelonumero 20063092) – Sarja sisältää reagensseja, joiden määrä riittää 24:n DNA-kirjaston ja 24:n RNA-kirjaston luomiseen. Potilasnäytteet ja kontrollit sisältyvät tähän määrään. Kontrollit myydään erikseen (katso [Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit sivulla 16](#)).
- Tietokanta: Päivitetään säännöllisesti ja ladattavissa Illumina Lighthouse -portaalista.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Illumina-luettelonumero 20051843), joka sisältää seuraavat komponentit:
 - TSO Comprehensive Claims -paketit
 - TSO Comprehensive -ohjelmistopaketti
 - TSO Comprehensive -USB-pakkaus

Illumina-huoltoedustaja asentaa sopivan TSO Comprehensive (EU) -analyysimoduuli -version Local Run Manager NextSeq 550Dx -laitte -laitteeseen. Asiakirjassa Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661) on lisätietoja analyysimoduulista.

Reagenssit

Mukana tulevat reagenssit

Seuraavat reagenssit toimitetaan TSO Comprehensive (EU) -pakkauksen mukana.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, DNA polymerase, RNAaasi H:ta ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja satunnaisia heksameerejä	-25 °C – -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää reverse transcriptase	-25 °C – -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), PN 20031118

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää T4-DNA polymerase ja polynukleotidikinaasia	-25 – -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja nukleotideja	-25 – -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	-25 – -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää ligaasia	-25 – -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yleiskäyttöisiä sekvensointioligonukleotideja	-25 – -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yleiskäyttöisiä sekvensointioligonukleotideja	-25 – -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	-25 – -15 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää DNA polymerase ja nukleotideja	-25 – -15 °C

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), PN 20031119

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	2 °C – 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vesiliuos, joka sisältää magneettihelmiä	2 °C – 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris-EDTA-liuos	2 °C – 8 °C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120

Aktiiviset ainesosat: puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yksittäin barcode-leimattuja oligonukleotidialukkeita.



HUOMIO

Käytä ainutkertaisia indeksialukkeita (UPxx) RNA- tai DNA-näytteisiin. Älä yhdistä CPxx- ja UPxx- indeksialukkeita samaan kirjastoon.

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

TruSight Oncology Comp CP Index Primers, PN 20031126

Aktiiviset ainesosat: puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yksittäin barcode-leimattuja oligonukleotidialukkeita.



HUOMIO

Käytä kombinatorisia indeksialukkeita (CPxx) vain DNA-näytteille. Älä yhdistä CPxx- ja UPxx-indeksialukkeita samaan kirjastoon.

Indeksialuke	Osanumero	Määrä	Tilavuus	i7-indeksi	Sekvenssi	i5-indeksi	Sekvenssi	Säilytyslämpötila
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C – -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C – -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C – -15 °C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C – -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C – -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C – -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C – -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C – -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C – -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C – -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C – -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C – -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C – -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C – -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C – -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C – -15 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), PN 20031123

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää formamidia ja suoloja	2 °C – 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja kiinteän faasin paramagneettisia helmiä, jotka on kovalettisesti pinnoitettu streptavidiinilla	2 °C – 8 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Natriumhydroksidiliuos	2 °C – 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Puskuroitu vesiliuos	2 °C – 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää kiinteän faasin paramagneettisia helmiä	2 °C – 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, 2-merkaptoetanolia ja formamidia	2 °C – 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	2 °C – 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	2 °C – 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vesiliuos, joka sisältää magneettihelmiä	2 °C – 8 °C

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), PN 20031121

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää oligonukleotideja	-25 °C – -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja	-25 °C – -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää detergenttiä	-25 °C – -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää DNA polymerase ja nukleotideja	-25 °C – -15 °C

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää P5- ja P7- alukkeita	-25 °C – -15 °C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, 2-merkaptetaanolia ja formamidia	-25 °C – -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 tai PhiX)	20031492	1	10 µl	Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää PhiX-genomi-DNA:ta	-25 °C – -15 °C

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reagenssi	Osanumero	Määrä	Tilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Oligonukleotidikoetinpooli	-25 °C – -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Oligonukleotidikoetinpooli	-25 °C – -15 °C

Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit

Monistusta edeltävät reagenssit

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents — katso reagenssivaatimukset kohdasta [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26](#)
- DNA and RNA Quantification Reagents — katso reagenssivaatimukset kohdasta [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26](#)
- TruSight Oncology Kontrollit:
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina-luettelonumero 20065041)
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina-luettelonumero 20065042)
- Etanoli (EtOH), 100 % (200 proof-yksikköä), molekyylibiologialaatuinen
- RNAasiton/DNAasiton-vesi

Monistuksen jälkeiset reagenssit

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 sykliä) (Illumina-luettelonumero 20028871)

- NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykliä)
- NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykliä)
- NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykliä)
- EtOH, 100 % (200 proof-yksikköä), molekyylibiologialaatuinen
- RNAasiton/DNAasiton-vesi

Reagenssin säilytys ja käsittely

Seuraavat reagenssilaatikat lähetetään pakastettuina. Säilytä lämpötilassa -25 – -15 °C.

Laatikko	Osanumero	Laboratorioalue
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze)	20031118	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze)	20031121	Monistuksen jälkeen
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Monistuksen jälkeen



HUOMIO

Älä säilytä reagensseja automaattisen sulatusjärjestelmän omaavassa säilytysyksikössä tai jääkaapin ovilokeroissa.

Seuraavat reagenssilaatikat toimitetaan geelipakkauksissa, jotta 0 °C –10 °C:n lämpötila voidaan ylläpitää. Säilytä 2 °C –8 °C:n lämpötilassa.

Laatikko	Osanumero	Laboratorioalue
TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate)	20031119	Ennen monistusta
TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate)	20031123	Monistuksen jälkeen



HUOMIO

Älä pakasta helmiä sisältäviä reagensseja (LNB1, SPB ja SMB).

- Reagenssien fyysisen ulkoasun muutos voi olla osoitus materiaalien huononemisesta. Jos ilmenee fyysisen ulkoasun muutoksia (kuten reagenssin värin muutoksia tai sameutta), älä käytä reagensseja.

- FSM:ssä, SSM:ssä, ERA1-B:ssä ja TCB1:ssä voi olla tuotteeseen liittyviä hiukkasia. Noudata kunkin reagenssin käsittelyohjeita. FSM:n ja SSM:n sekoitusvaiheiden jälkeen jäljelle jääneet valkoiset tuotteeseen liittyvät hiukkaset eivät vaikuta suorituskykyyn.
- TSO Comprehensive (EU) -määrityksen stabiilius on arvioitu ja sen suorituskyky on osoitettu enintään neljälle pakkauksen käyttökerralle. Reagenssit ovat stabiileja, kun niitä säilytetään ilmoitetuissa lämpötiloissa laatikon etiketissä mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

Välineet ja materiaalit

Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Monistusta edeltävät välineet ja materiaalit

Välineet	Toimittaja
Ultrasonikaattori ja siihen liittyvät varusteet Katso kohta Ultrasonikaattorin määritykset DNA-fragmentointia varten sivulla 21 .	Yleinen laboratoriotoimittaja
PCR-laite, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Lämmitetty kansi, jonka voi asettaa 30 °C:seen ja 100 °C:seen (tai kytkeä pois päältä, jos ei voi asettaa 30 °C:seen) • Kattaa lämpötila-alueen 4 °C – 99 °C • ±0,25 °C:n lämpötilatarkkuus • Yhteensopiva 96-kuoppaisten PCR-levyjen kanssa, 0,2 ml • Katso PCR-laitteen nousunopeus sivulla 24 	Yleinen laboratoriotoimittaja
Vorteksointilaite	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikronäyteinkubaattorit (2) 96-kuoppaisten MIDI-levyjen (2) sisäosilla	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikrosentrifugi	Yleinen laboratoriotoimittaja
Levysentrifugi, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Yhteensopiva 96-kuoppaisten mikrolevyjen kanssa • Kapasiteetti 280 × g (+/-10 %) 	Yleinen laboratoriotoimittaja
Levyjen ravistin, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm:n rata • Mahdollisuus ravistaa nopeudella 1 200 rpm ja 1 800 rpm 	Yleinen laboratoriotoimittaja
Tiivistyskiila tai -tela	Yleinen laboratoriotoimittaja

Välineet	Toimittaja
<p>Magneettinen jalusta, jolla on seuraavat ominaisuudet:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Suunniteltu paramagneettisten helmien saostamiseen/erotukseen • Magneetit jalustan sivuilla (ei pohjassa) • Yhteensopiva 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa 	Yleinen laboratoriotuottaja
<p>Tarkkuuspipetit, jotka pystyvät annostelevaan tarkasti 2 – 1 000 µl:n tilavuudet seuraavin määrityksin:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,02 µl • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,1 µl, 0,2 µl tai 0,5 µl • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 1 µl tai 2 µl <p>Pipetit on kalibroitava säännöllisesti ja niiden on oltava tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta.</p>	Yleinen laboratoriotuottaja
Pipetointiväline	Yleinen laboratoriotuottaja
Jää- tai kylmäblokki	Yleinen laboratoriotuottaja
10 ml:n serologisia pipettejä	Yleinen laboratoriotuottaja
<p>96-kuoppalevyjen liimapintaiset sulkukannet, joilla on seuraavat ominaisuudet:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Irrotettava • Sopiva "skirted"- tai "semi-skirted"-tyypin PCR-levyille • Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilanvaihteluja alueella -20...+100 °C • DNAasiton/RNAasiton 	Yleinen laboratoriotuottaja
Mikrosentrifugiputket, joiden kapasiteetti on 1,7 ml, nukleasittomat	Yleinen laboratoriotuottaja
Nukleasittomat reagenssisäiliöt (kertakäyttöinen kaukalomalli, 50 ml) (tai vastaava)	Yleinen laboratoriotuottaja
15 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotuottaja
50 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotuottaja
Yhteensopivat aerosolinkestävät pipettikärjet	Yleinen laboratoriotuottaja
96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levyt)	Fisher Scientific, osanumero AB-0859 tai vastaava
96-kuoppaiset PCR -levyt, yhteensopivia PCR-laitteen kanssa, 0,2 ml (polypropeenikuopat)	Yleinen laboratoriotuottaja

Monistuksen jälkeiset välineet ja materiaalit

Välineet	Toimittaja
NextSeq 550Dx -laite	illumina, luettelonumero 20005715
Levysentrifugi, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Yhteensopiva 96-kuoppaisten mikrolevyjen kanssa • Kapasiteetti 280 × g (+/-10 %) 	Yleinen laboratoriotuottaja
PCR-laite, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Lämmitetty kansi (100 °C) • Kattaa lämpötila-alueen 4 °C – 99 °C • ±0,25 °C:n lämpötilatarkkuus • Yhteensopiva 96-kuoppaisten PCR-levyjen kanssa, 0,2 ml • Katso PCR-laitteen nousunopeus sivulla 24 	Yleinen laboratoriotuottaja
Vorteksointilaite	Yleinen laboratoriotuottaja
Mikronäyteinkubaattori 96-kuoppaisten MIDI-levyjen insertilla	Yleinen laboratoriotuottaja
Kuivalämpöblokki, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Lämpötila-alue 25 °C – 99 °C • ±5 °C:n lämpötilatarkkuus • Varmista, että mikrosentrifugiputket ovat yhteensopivia lämpöblokin kanssa 	Yleinen laboratoriotuottaja
Levyjen ravistin, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm:n rata • Mahdollisuus ravistaa nopeudella 1 200 rpm ja 1 800 rpm 	Yleinen laboratoriotuottaja
Mikrosentrifugi	Yleinen laboratoriotuottaja
Tiivistyskiila tai -tela	Yleinen laboratoriotuottaja
Magneettinen jalusta, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Suunniteltu paramagneettisten helmien saostamiseen/erotukseen • Magneetit jalustan sivuilla (ei pohjassa) • Yhteensopiva 96 kuopan MIDI-levyjen kanssa 	Yleinen laboratoriotuottaja
Tarkkuuspipetit, jotka pystyvät annostelemaan tarkasti 2–1 000 µl:n tilavuudet seuraavin määrityksin: <ul style="list-style-type: none"> • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,02 µl • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,1 µl, 0,2 µl tai 0,5 µl • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 1 µl tai 2 µl Pipetit on kalibroitava säännöllisesti ja niiden on oltava tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta.	Yleinen laboratoriotuottaja
Pipetointiväline	Yleinen laboratoriotuottaja

Välineet	Toimittaja
10 ml:n serologisia pipettejä	Yleinen laboratoriotoimittaja
96-kuoppalevyjen liimapintaiset sulkukannet, joilla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Irrotettava • Sopiva "skirted"- tai "semi-skirted"-tyypin PCR-levyille • Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilanvaihteluja alueella -20...+100 °C • DNAasiton/RNAasiton 	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikrosentrifugiputket, joiden kapasiteetti on 2 ml, nukleaasittomat	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikrosentrifugiputket, joiden kapasiteetti on 1,7 ml, nukleaasittomat	Yleinen laboratoriotoimittaja
Nukleaasittomat reagenssisäiliöt (kertakäyttöinen kaukalomalli, 50 ml) (tai vastaava)	Yleinen laboratoriotoimittaja
15 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
50 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
Yhteensopivat aerosolinkestävät pipettikärjet	Yleinen laboratoriotoimittaja
96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levyt)	Fisher Scientific, osanumero AB-0859 tai vastaava
96-kuoppaiset PCR -levyt, yhteensopivia PCR-laitteen kanssa, 0,2 ml (polypropeenikuopat)	Yleinen laboratoriotoimittaja
Jää- tai kylmäblokki	Yleinen laboratoriotoimittaja

Ultrasonikaattorin määriykset DNA-fragmentointia varten

DNA:n fragmentointi eli shearing vaikuttaa määriyksen suorituskykyyn määrittämällä fragmentin koon jakauman, mikä puolestaan vaikuttaa sekvensoinnin kattavuuteen. Useita fokusoidun ultrasonikaation asetuksia arvioitiin ja optimoitiin TSO Comprehensive (EU) -määriykselle ([Taulukko 4](#)).

- Fragmentointiaika säädettiin maksimoimaan MEDIAN_EXON_COVERAGE-mittari, josta on annettu yhteenveto kohdassa [Laadunvalvonta sivulla 79](#). Fragmentointiajat (kts. [Taulukko 4](#)) ja MEDIAN_INSERT_SIZE-tulokset olivat erilaisia eri määriyksissä.
- Kokoonpanot 1— 4 ja 6 testattiin 8-sarjan lasiputkilla. Kokoonpanossa 5 käytettiin yhtä lasiputkea. Putken tilavuuskapasiteetit on esitetty [Taulukko 4](#).
- Kokoonpanojen 3–6 (pienemmät vesihaudetilavuudet) optimoinnissa käytettiin pulsointia.
- Kokoonpanot 3–5 fragmentoitiin pienemmän tilavuuden putkiin. Putken tilavuuskapasiteetit vaikuttavat fragmentointiparametreihin.

- Kokoonpano 4 (linja-anturi, keskikokoinen vesihaudetilavuus, vesi jonka kaasu on poistettu) tarvitsi pitkän pulssiviiveen (40 sekuntia), jotta saavutettiin samanlainen MEDIAN_EXON_COVERAGE kuin kokoonpanoilla 1 ja 2 nimellisellä 40 ng:n syötteellä.
- Kokoonpanon 3 optimaaliset asetukset johtivat hieman suurempaan fragmenttikoon jakautumiseen muihin kokoonpanoihin verrattuna (MEDIAN_INSERT_SIZE oli noin 5–10 emäsparia suurempi).
- Kokoonpanoissa 3 ja 5 käytettiin vettä, josta ei ole poistettu kaasua, sekä pienintä vesihaudetilavuutta.
- Kokoonpanoja 3 ja 5 varten oli käytettävä suurempaa DNA-syötettä (50 ng kokoonpanossa 3, 60 ng kokoonpanossa 5), jotta saavutettiin samanlainen MEDIAN_EXON_COVERAGE verrattuna muihin neljään kokoonpanoon, joissa käytettiin nimellistä 40 ng:n syötettä.
- Kokoonpanoissa 3 ja 5 on enemmän vaurioita ja/tai denaturointia ja näin ollen vähemmän käytettävissä olevien dsDNA-molekyylien todellista massaa kirjaston valmistelua varten.

Sentrifugoi fragmentointiputket talteenotto-prosessin aikana sen takaamiseksi, että nimetty tilavuus saavutetaan, sillä kaikki materiaalin menetykset voivat heikentää suorituskykyä.

Taulukko 4 Fokusoitun ultrasonikaattorin määrittämiset arvioituina

Parametri	Määrittäminen					
	1	2	3	4	5	6
Anturi	Linja	Piste	Piste	Linja	Piste	Linja
Vesihautteen tilavuus	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml	1,7 l
Vesi, jonka kaasu on poistettu	Kyllä	Kyllä	Ei	Kyllä	Ei	Kyllä
Vedenjäähdytin	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Vesihautteen lämpötila	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C	10 °C
Tulosignaalin tehokuippu (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
Hyötykerroin, %	30	10	30	25	20	25
Jaksoja/purske	200	200	1000	1000	1000	600
Pulsointi (10 sekunnin purskeet)	Ei	Ei	Kyllä	Kyllä	Kyllä	Kyllä
Pulsoinnin viiveaika	Ei sovellu	Ei sovellu	10 s	40 s	10 s	10 s
Fragmentointiaika	250 s	280 s	200 s ¹	320 s ²	200 s ¹	320 s ²
Näytteiden käsitteleminen	1–8	1	1	1–8	1	1–8
Hauteen koko	1–96	1–96	1–8	1–8	1	1–96
Lasisen 8-putkisen liuskan näytekokoo	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Yksi putki (50 µl)	130 µl (tai 96 mikroTUBE-levyä)
Värähtely	Ei sovelleta	Ei sovellu	Ei sovelleta	3 mm Y-akselin suuntaan nopeudella 20 mm/s	Ei sovelleta	1,5 mm Y-akselin suuntaan nopeudella 10 mm/s
DNA-syötteen ekvivalentti (eksonikattavuuden mediaani)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ 200 sekunnin fragmentointiaika käsittää 10 sekunnin purskeita, joita toistetaan 20 kertaa.

² 320 sekunnin fragmentointiaika käsittää 10 sekunnin purskeita, joita toistetaan 32 kertaa.

PCR-laitteen nousunopeus

PCR-laitteen nousunopeus vaikuttaa määrittämisen QC-mittareihin (käytettävissä olevat MSI-kohdat, PCR-laitteen nousunopeus vaikuttaa määrittämisen mediaanisäilöjen määrän CNV-kohde, mediaani-inserttikoko [RNA]) sekä liitosvariantteja ja fuusioita tukeviin readeihin. PCR-laitteen nousunopeuden optimointia suositellaan. Esimerkiksi testattua mallia säädettiin nousunopeuden oletuksena olevasta nousunopeudesta (ja maksimiarvosta) 5 °C/s nopeuteen 3 °C/s, jotta saataisiin vertailukelpoisia tuloksia muihin malleihin, joissa on pienemmät oletusnousunopeudet.

Näytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen

Noudata vakiomenettelyä, kun keräät, kuljetat, varastoit ja käsittelet näytteitä.

Näytettä koskevat vaatimukset

FFPE-kudos

TSO Comprehensive (EU) -määritys edellyttää 40 ng RNA:ta ja/tai 40 ng DNA:ta, joka on uutettu FFPE-kudoksesta. Käyttämällä sekä RNA:ta että DNA:ta voidaan analysoida kaikki ilmoitetut varianttityypit. Kudos on kiinnitettävä käyttämällä molekyylianalyysiin sopivaa formaliinifiksatiivia (esimerkiksi 10-prosenttinen neutraalipuskuroitu formaliini). Kudoksesta ei saa poistaa kalkkia. Ennen TSO Comprehensive (EU) -määrityksen suorittamista patologin tulee tutkia kudoksenäyte varmistaakseen, että se soveltuu tähän testiin. Somaattisten ajajamutaatioiden havaitsemiseksi tarvitaan vähintään 20 %:n kasvainsisältö (alueittain). MSI-tilan luotettava havaitseminen erilaisista näytteistä edellyttää vähintään 30 %:n kasvainsisältöä. Jos näyte testataan alle 30 %:n kasvainsisällöllä muiden varianttityyppien tulosten määrittämiseksi, MS-Stabiili-tulos voi olla epäluotettava. MSI-Korkea-tulos on oikea kasvainsisällöstä riippumatta.

Geenin monistumisten ja RNA-varianttien kasvainsisältö riippuu monistumisen tai fuusion ilmentymisen laajuudesta (kts. kohta [Kasvainsisältö sivulla 102](#)).

Jotta saadaan suuri todennäköisyys eristää 40 ng RNA:ta ja 40 ng DNA:ta eri kiinteistä kudostyypeistä, suositeltu kudostilavuus on $\geq 1,0 \text{ mm}^3$. Tämä tilavuus vastaa kumulatiivista elinkelpoista $\geq 200 \text{ mm}^2$:n kudospinta-alaa käyttäen $5 \mu\text{m}$:n paksuisia leikkeitä tai $\geq 100 \text{ mm}^2$ käyttäen $10 \mu\text{m}$:n paksuisia leikkeitä. Kumulatiivinen kudospinta-ala on elinkykyisen kudosalueen summa kaikista uuttamiseen toimitetuista leikkeistä. Esimerkiksi kumulatiivinen kudospinta-ala 200 mm^2 voidaan saavuttaa uuttamalla neljä $5 \mu\text{m}$:n leikettä, joissa on 50 mm^2 kudospinta-alaa, tai viisi $10 \mu\text{m}$:n leikettä, joissa kussakin on 20 mm^2 kudospinta-alaa. Kudoksen nekroosi voi vähentää nukleiinihapon saantoa. Väärien negatiivisten tulosten mahdollisuuden minimoimiseksi kudos voidaan dissektoida makrotasolla toivottavan elinkelpoisen kasvainsisällön saavuttamiseksi.

Suuri määrä nekroottista kudosta ($\geq 23 \%$, pinta-alan mukaan mitattuna) voi haitata TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kykyä havaita geenin monistumisia ja RNA-fusioita. Jos yli 23 % näyteosien kokonaispinta-alasta on nekroottista kudosta, nekroottinen kudos tulee dissektoida makrotasolla. Jos laboratorio käyttää RNA:ta määrityksen kanssa, hemoglobiinia sisältävää kudosta on vältettävä tai se on minimoitava, kun leikkeitä otetaan kudosplokkista. Katso kohta [Häiritsevät aineet sivulla 93](#).

Objektilasille preparoitua FFPE-kudosta voidaan säilyttää enintään 28 vuorokauden ajan huoneenlämmössä.

Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys

- Eristä RNA ja DNA FFPE-kudosnäytteistä käyttämällä kaupallisesti saatavilla olevia uuttamispakkauksia. Uuttamispakkausten erot voivat vaikuttaa tehokkuuteen. Katso [Nukleiinihapon uuttamispakkauksen arviointi sivulla 91](#).
- Proteinaasi K:ta tai vastaavaa entsyymiä ei saa lisätä uuttamisen aikana uuttamispakkauksessa annetusta vakioipitoisuudesta. Katso kohta [Häiritsevät aineet sivulla 93](#).
- Säilytä uutetun nukleiinihapon kantaliuosta uuttamispakkauksen valmistajan ohjeiden mukaan.
- Säilytä uutettua DNA:ta enintään 28 vuorokauden ajan -25 °C – -15 °C:n lämpötilassa.
- Säilytä uutettua RNA:ta enintään 28 vuorokauden ajan -85 °C – -65 °C:n lämpötilassa.
- Jotta pitoisuus ei vaihtelisi ajan kuluessa, mittaa DNA ja RNA 28 vuorokauden sisällä ennen kirjaston valmistelun aloittamista. Kvantifioi RNA ja DNA käyttämällä fluorometristä kvantifiointimenetelmää, jossa hyödynnetään nukleiinihapposidonnan väriaineita. Nukleiinihapon pitoisuuden tulee olla vähintään kolmen mittauksen keskiarvo.
- Määrittämiseen tarvitaan 40 ng kutakin RNase/DNase-free water -veteen (ei kuulu toimitukseen) valmistettua RNA-näytettä lopullisen tilavuuden ollessa 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Määrittämiseen tarvitaan 40 ng kustakin gDNA-näytteestä uuttamisen vähimmäispitoisuuden ollessa 3,33 ng/µl. Leikkaukseen tarvitaan lopullinen tilavuus 52 µl (0,77 ng/µl), jossa on vähintään 40 µl TEB (kuuluu toimitukseen), jota käytetään laimentimena.

Kirjaston säilytys

Voit säilyttää kirjastoja alhaisen sitoutumisen PCR-levyillä 7–32 päivän ajan kirjastotyyppistä riippuen (katso [Taulukko 5](#)).

Taulukko 5 Kirjaston säilytysajat

Kirjastotyyppi	Levy	Päivien lukumäärä	Säilytyslämpötila
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25 °C – -15 °C
Fragmentoitu gDNA	LP PCR	≤ 7	-25 °C – -15 °C
Esirikastus	ALS PCR	≤ 30	-25 °C – -15 °C
Jälkirikastus	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C – -15 °C
Jälkirikastuksen PCR	PL PCR	≤ 30	-25 °C – -15 °C
Normalisoitu	NL PCR	≤ 32	-25...-15 °C

Varoitukset ja varotoimet

Turvallisuus



VAROITUS

Tämä reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Ilmanvaihdon on oltava asianmukaista reagensseissa olevien vaarallisten aineiden käsittelylle. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojäkäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa support.illumina.com/sds.html.

- Kaikkia näytteitä on käsiteltävä tartuntavaarallisina aineina.
- Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai määritysreagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja koereagenssien käsittelyn jälkeen.

Laboratorio

- Järjestä laboratorioon yksisuuntainen työnkulku kontaminaation estämiseksi. Monistusta edeltävän ja sen jälkeisen työn alueilla on oltava omat laitteet ja varusteet (esimerkiksi pipetit, pipettikärjet, vorteksilaite ja sentrifugi). Monistustuotteen tai koettimen siirtymisen estämiseksi tulee välttää palaamista monistusta edeltävälle alueelle sen jälkeen, kun olet mennyt monistuksen jälkeiselle alueelle.
- Suorita PCR-indeksoinnin ja rikastuksen vaiheet monistuksen jälkeisellä alueella monistustuotteen siirron estämiseksi.
- Kirjaston valmistelumenettelyt edellyttävät RNAasista/DNAasista-puhdasta ympäristöä. Dekontaminoi työalueet perusteellisesti RNAasia/DNAasia-estävällä puhdistusaineella. Käytä muoveja, joiden on sertifioitu olevan puhtaita DNAasista, RNAasista ja ihmisen genomi-DNA:sta.
- Puhdista monistamisen jälkeisissä toimenpiteissä työpinnat ja laitteet huolellisesti ennen jokaista toimenpidettä ja sen jälkeen juuri valmistetulla 0,5-prosenttisella natriumhypokloriittiliuoksella (NaOCl). Anna liuoksen olla kosketuksessa pintoihin 10 minuutin ajan ja pyyhi sitten perusteellisesti 70-prosenttisellä etyyli- tai isopropyylialkoholilla.
- Käytä nukleaasivapaita mikrosentrifugiputkia, levyjä, pipettikärkiä ja säiliöitä.
- Käytä kalibroituja laitteita koko määrityksessä. Varmista, että kalibroiti laitteet tässä protokollassa määritettyjen nopeuksien, lämpötilojen ja määrien mukaan.

- Käytä tarkkuuspipettejä reagenssien ja näytteiden tarkan lisäämisen varmistamiseksi. Kalibroi säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.
- Noudata seuraavia ohjeita, kun käytät monikanavaisia pipettejä:
 - Pipetoi vähintään $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Varmista, että tulppakärjet ovat hyvin paikalleen istuvia ja sopivat monikanavaisen pipetin merkille ja mallille.
 - Kiinnitä kärjet etenevällä pyörintäliikkeellä varmistaaksesi, että kaikki kärjet kiinnittyvät yhtä hyvin.
 - Aspiroi 90 asteen kulmassa niin, että kaikissa kärjissä on yhtä paljon nestettä.
 - Sekoita kaikki osat annostelun jälkeen pipetoimalla reaktioseosta ylös ja alas.
 - Tarkista annostelun jälkeen, että kaikki neste on annosteltu joka kärjestä.
- Varmista, että käytät määritykseen vaadittuja laitteita ja asetat ohjelmat ohjeiden mukaisesti.
- PCR-laitteen ja mikronäyteinkubaattorin ilmoitetut lämpötilat osoittavat reaktiolämpötilan, ei välttämättä laitteeseen asetettua lämpötilaa.

Määrittäminen

- Vältä ristikontaminaatiota.
 - Noudata asianmukaisia laboratorionkäytäntöjä käsitellessäsi näytteitä ja reagensseja.
 - Käytä uusia kulutustarvikkeita ja uusia pipettikärkiä näytteiden välillä ja reagenssien lisäämisen välillä.
 - Ristikontaminaatoriskin pienentämiseksi käytä aerosoliresistenttejä kärkiä.
 - Käytä yksisuuntaista työkulkua siirryttäessä monistusta edeltäviltä monistuksen jälkeisille alueille.
 - Käsittele ja avaa vain yksi indeksialuke kerrallaan. Aseta kunkin indeksiputken korkki takaisin paikoilleen heti käytön jälkeen. Pakkauksessa on ylimääräisiä korkkeja.
 - Vaihda käsineet usein ja aina jos ne joutuvat kosketuksiin indeksialukkeiden tai näytteiden kanssa.
 - Poista käyttämättömät indeksialukeputket työalueelta.
 - Älä palauta reagensseja varastoputkiin sen jälkeen, kun niitä on käytetty putkiliuskan, kaukalon tai säiliön yhteydessä.
 - Sekoita näytteet pipetillä ja sentrifugoi levy, kun niin osoitetaan.
 - Käytä mikrolevyravistinta. Älä vorteksoi levyjä.
- Älä vaihda eri reagenssipakkauserien määrittämissä komponentteja keskenään. Reagenssipakkauksen erät on merkitty reagenssipakkauksen etikettiin ja pääerän arkille.
- On noudatettava asianmukaisia laboratorionkäytäntöjä, jotta nukleasit ja PCR-tuotteet eivät kontaminoisi reagensseja, instrumentteja, näytteitä ja kirjastoja. Nukleasin ja PCR-tuotteen kontaminaatio voi aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia.
- Määrittämissä optimaalinen suorituskyky ja säilytys edellyttää asianmukaista levytyyppiä. Muista noudattaa kohdassa [Käyttöohjeet sivulla 38](#) olevia levynsiirto-ohjeita.

- Jos annettuja ohjeita ei noudateta, tuloksena voivat olla virheelliset tulokset tai kirjaston laadun merkittävä heikentyminen.
- Ellei turvallista pysähtymispistettä ole määritetty kohdassa [Käyttöohjeet sivulla 38](#), jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.
- Säilytä määritysreagenssit tai -komponentit määritetyssä lämpötilassa merkityillä monistusta edeltävillä ja monistuksen jälkeisillä alueilla.
- Älä säilytä reagensseja automaattisen sulatusjärjestelmän omaavassa säilytysyksikössä tai jääkaapin ovilokeroissa.
- Älä pakasta helmiä sisältäviä reagensseja (LNB1, SPB ja SMB).
- Älä käytä väärin säilytettyjä reagensseja.
- Älä poikkea kullekin reagenssille määritellyistä sekoitus- ja käsittelyohjeista. Reagenssien riittämätön sekoittaminen tai liiallinen vortekointi voi johtaa epäonnistuneisiin näytetuloksiin.
- FSM:ssä, SSM:ssä, ERA1-B:ssä ja TCB1:ssä voi olla tuotteeseen liittyviä hiukkasia. Noudata kunkin reagenssin käsittelyohjeita. FSM:n ja SSM:n sekoitusvaiheiden jälkeen jäljelle jääneet valkoiset tuotteeseen liittyvät hiukkaset eivät vaikuta suorituskykyyn.
- Valmista tuoreet master mix -seokset ja hävitä jäljellä oleva määrä käytön jälkeen.
- Valmista aina tuore 80-prosenttinen etanoliliuos RNase/DNase-free water pesuvaiheita varten. Etanoli voi absorboida vettä ilmasta, mikä voi vaikuttaa tuloksiin. Hävitä 80-prosenttinen etanoliliuos käytön jälkeen voimassa olevien määräysten mukaisesti.
- Siirrä määritetty eluaattimäärä. Määritettyä pienemmän eluaattimäärän siirtäminen eluointivaiheiden aikana voi vaikuttaa tuloksiin.
- Noudata seuraavia ultrasonikaattoreita koskevia ohjeita. Muista noudattaa valmistajan ohjeita.
 - Lisää gDNA ultrasonikaattorin putkeen hitaasti välttääksesi kuplien muodostumisen. Liialliset kuplat tai ilmarako fragmentointiputkessa voivat johtaa puutteelliseen fragmentoitumiseen.
 - Annostele ultrasonikaattorin putkiin hitaasti ja vältä roiskumista.
 - Älä työnnä pipettikärkeä ultrasonikaattorin putken pohjaan, kun poistat fragmentoitunutta DNA:ta, jotta nesteen siirtyminen ja näytteen häviäminen voidaan välttää.
- Älä pipetoi alle 2 µl:n näytemäärää.
- Älä käytä kaukaloa reagenssien lisäämiseen niitä vaiheita varten, joissa edellytetään alle 10 µl:n materiaalin lisäämistä jokaiseen näytesyvennykseen.
- Käytä ohutkärkistä pipettiä siirtäessäsi fragmentoituneita DNA-näytteitä ultrasonikaattorin putkista Library Prep (LP) -levylle.
- Älä yhdistä SUA1- ja UMI-adaptoreita toisiinsa.
- Käytä SUA1-adaptoreita RNA-näytteiden kanssa.
- Käytä UMI-adaptoreita DNA-näytteiden kanssa.

- Määritä kullekin kirjaston näytteelle eri indeksialukkeet, jotta jokainen kirjasto voidaan tunnistaa yksilöivästi, kun se yhdistetään sekvensointia varten yhteen virtauskyvettiin.
- Älä yhdistä CPxx- ja UPxx-indeksialukkeita samaan kirjastoon.
- Näytteiden ja indeksialukkeiden yhteensopimattomuudet voivat saada aikaan virheellisen tulosraportoinnin johtuen positiivisen näytteen tunnistuksen menettämisestä. Lisää näytetunnukset ja määritä indeksit Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -analyysimoduulissa ennen kirjaston valmistelun aloittamista. Kirjaa näytetunnukset, indeksointi ja levyn kuoppasuunta viitteeksi kirjaston valmistelun yhteydessä.
- Käytä RNA-näytteistä johdettuihin kirjastoihin vain UPxx-indeksejä.
- Käytä DNA-näytteistä johdettuihin kirjastoihin UPxx- tai CPxx-indeksejä.
- Sekvensoi enintään 8 RNA-kirjastoa ja 8 DNA-kirjastoa virtauskyvetiä kohti. Sekvensoi vähintään kolme kirjastoa. Noudata ohjeita kohdasta [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 34](#).
- Kohtien [Kohteiden 1 sieppaaminen sivulla 59](#) ja [Kohteiden 2 sieppaaminen sivulla 63](#), sidontavaiheen jälkeen siirry välittömästi pesuvaiheeseen helmipellettien kuivumisen estämiseksi.
- Poista pesuvaiheiden yhteydessä kaikki 80-prosenttinen etanoli kuoppien pohjasta. Etanolijäämien on todettu vaikuttavan tuloksiin.
- Jotta määrittäminen toimisi parhaalla mahdollisella tavalla, noudata kohdassa [Käyttöohjeet sivulla 38](#)) ilmoitettua pesukertojen määrää.
- Suspendoi menettelyn [Kirjastojen normalisointi sivulla 70](#) aikana kirjaston helmipelletti uudelleen perusteellisesti, jotta virtauskyvetin klusteritiheys on yhtenäinen.
- Kaikista tähän tuotteeseen liittyvistä vakavista vaaratilanteista on välittömästi ilmoitettava Illuminalle ja toimivaltaisille viranomaisille siinä valtiossa, missä käyttäjä ja potilas ovat.

Menetelmää koskevia huomautuksia

- TSO Comprehensive (EU) -työnkulku voidaan suorittaa seuraavan aikataulun mukaisesti:
 - Päivä 1: cDNA-synteesi RNA-näytteistä, DNA-fragmentointi gDNA-näytteistä, kirjaston valmistelu ja yön suoritettavan (ensimmäisen) hybridisaation aloittaminen.
 - Päivä 2: Kirjastojen rikastus, rikastettujen kirjastojen normalisointi sekä kirjastojen lataus NextSeq 550Dx -laitteeseen.
- Mikäli TSO Comprehensive (EU) -työnkulkua ei voida suorittaa tämän aikataulun mukaan, useita turvallisia pysähdyspisteitä määritetään kautta protokollan. Ellei turvallista pysähtymispistettä ole määritetty protokollassa, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.
- RNA- ja DNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot voidaan valmistella samanaikaisesti erillisissä kuopissa.
 - Tilavuus on ylimitoitettu master mix -seoksen valmistelutaulukoissa sen varmistamiseksi, että tilavuus on riittävä käsiteltävien näytteiden määrää varten.
 - Käytä molekyyliilaatuista vettä, jossa ei ole nukleaaseja.

- Huuhtele reagenssin lisäämisen jälkeen kärki aspiroimalla ja annostelemalla kerran levyn asianmukaiseen kuoppaan, ellei toimenpiteessä ole muuta määritetty.
- Huoneenlämpötilan määritelmänä on 15–30 °C.
- Reagenssit, näytteet ja kirjastot on pidettävä kylmässä käyttöohjeiden tietyissä vaiheissa. Tämän määritelmä on jää tai vastaava.

PCR-laitteen ohjelmat

- Ohjelmoi lämpöblokkiohjelmat esimonistus- ja jälkimonistuslaitteessa ennen protokollan käynnistämistä.
- Varmista, että PCR-levyt sopivat tiukasti paikalleen PCR-laitteessa.
- Käytä PCR-laitteen valmistajan suosittelemia levyjä.

Levyn peittäminen ja avaaminen

- Peitä aina levyt uudella levyn liimapintaisella sulkukannella. Älä käytä sulkukansia uudelleen.
- Peitä levy kiinnittämällä liimapintainen kansi tiukasti levyyn tiivistyskiilalla tai -telalla.
- Peitä aina 96 kuopan levy uudella levyn liimapintaisella sulkukannella ennen protokollan seuraavien vaiheiden suorittamista.
 - Levyn ravisteluvaiheet
 - Sentrifugointivaiheet
 - PCR-laitevaiheet
 - Hybridisaatiot
 - Pitkäaikainen säilytys
- Varmista, että reunat ja kuopat on peitetty, jotta voidaan vähentää ristikontaminaation ja haihtumisen riskiä.
- Aseta levy tasaiselle pinnalle, ennen kuin poistat sulkukannen hitaasti.
- Jos sulkukannella tai levyn kuoppien sivuseinämillä havaitaan nestettä tai kondensoitumista, sentrifugoi ennen avaamista kiihtyvyydellä 280 x g 1 minuutin ajan.
- Käytä liimapintaisia levyn sulkukansia, jotka toimivat –20...+100 °C:n lämpötilassa ja sopivat "skirted"- tai "semi-skirted"-tyypin PCR-levyille.

Välineet

- Varmista, että laboratoriohenkilöstö tuntee kaikkien laitteiden käyttöä ja kunnossapitoa koskevat valmistajan ohjeet ennen määrittämisen käynnistämistä.

Levyn tyyppi ja levyn siirrot

- Määrittämisen optimaalinen suorituskyky ja säilytys edellyttää asianmukaista levytyyppiä.

- Kun tilavuuksia siirretään levyjen välillä, siirrä määritetty tilavuus levyn kustakin kuopasta kohdelevyn vastaavaan kuoppaan.
- Monikanavapipettejä voidaan käyttää, kun siirretään näytteitä putkiliuskojen tai levyjen välillä.
- Noudata putkia ravisteltaessa seuraavia ohjeita.
 - Käytä levyjen ravisteluun levyravistinta. Älä vorteksoi levyjä.
 - Ravistele PCR-levyjä nopeudella 1 200 rpm.
 - Ravistele MIDI-levyjä nopeudella 1 800 rpm.
 - Varmista noudattamalla valmistajan ohjeita, että levyravistin pitää levyn tiukasti paikallaan.

Sentrifugointi

- Kun protokollan ohjeissa kehoitetaan sentrifugoimaan lyhyesti, sentrifugoi kiihtyvyydellä $280 \times g$ 1 minuutin ajan.
- Jos sulkukannessa tai kuopan sivuseinämillä havaitaan nestettä, sentrifugoi levyä kiihtyvyydellä $280 \times g$ 1 minuutin ajan.

Reagenssien käsittely

- Sulje kaikki reagenssiputket uudelleen välittömästi käytön jälkeen haihtumisen rajoittamiseksi ja kontaminaation ehkäisemiseksi.
- Palauta reagenssit määritettyyn säilytyslämpötilaan, kun niitä ei enää tarvita toimenpidettä varten.
- Suorita reagenssin valmistelutoimet, jotka edeltävät kutakin toimenpideosiota [Käyttöohjeet sivulla 38](#).
- Varmista, että master mix- ja Elution Mix -seosta sekä 80-prosenttista etanolia valmistetaan tarvittava määrä käsittelemiäsi näytteitä varten.
- Master mix- ja liuostaulukoissa ilmoitetut tilavuudet ovat ylimitoitettuja. Tilavuuden ylimitoituslaskelmat tehdään seuraavasti.
 - [Taulukko 14](#)
 - FSM-tilavuus = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{näytteiden} + \text{kontrollien määrä}) \times (1,25)$.
 - RVT-tilavuus = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{näytteiden} + \text{kontrollien määrä}) \times (1,25)$.
 - [Taulukko 21](#)
 - ERA1-B-tilavuus = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,20)$.
 - ERA1-A-tilavuus = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,20)$.
 - [Taulukko 29](#)
 - EE2-tilavuus = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - HP3-tilavuus = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - [Taulukko 30](#)
 - EE2-tilavuus = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.

- HP3-tilavuus = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
- [Taulukko 36](#)
 - LNA1-tilavuus = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (2,0)$.
 - LNB1-tilavuus = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (2,0)$.
- [Taulukko 37](#)
 - EE2-tilavuus = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,25)$.
 - HP3-tilavuus = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,25)$.

Adapterisarjat

- TSO Comprehensive (EU) -määritys sisältää SUA1- ja UMI-adaptorit.
- SUA1-adaptoreita käytetään RNA-näytteiden kanssa. Ei saa käyttää DNA-näytteiden kanssa.
- UMI-adaptoreita käytetään DNA-näytteiden kanssa. Ei saa käyttää RNA-näytteiden kanssa.

Helmien käsittely

- TSO Comprehensive (EU) -määritykseen sisältyy kolmentyyppisiä helmiä (SPB, SMB ja LNB1). Varmista, että toimenpiteen aikana käytetään oikeaa helmityyppiä.
- Tee kunkin helmityypin osalta oikea määrä pesuja.
- Varmista ennen käyttöä, että helmet ovat huoneenlämpötilassa.
- Sekoita helmiä homogeneisuuden varmistamiseksi 1 minuutin ajan ennen käyttöä.
- Noudata seuraavia ohjeita, kun sekoitat helmiä pipetillä:
 - Käytä sekoittamaasi tilavuuteen sopivaa pipettiä ja kärkikokoa.
 - Säädä tilavuusasetusta noin 50–75 %:iin näytteen tilavuudesta.
 - Pipetoi hitaasti vapauttamatta mäntää.
 - Vältä roiskeita ja kuplien muodostumista.
 - Sijoita pipetti pelletin yläpuolelle ja annostele suoraan pellettiin helmien vapauttamiseksi kuopasta tai putkesta.
 - Varmista, että helmipelletti on kokonaan liuoksessa. Liuoksen pitäisi olla tummanruskeaa, ja sen koostumuksen pitäisi olla homogeenista.
 - Arvioi, onko helmipellettiä. Aspiroi varovasti kuopan koko helmiliuosta kärkeen ja katso kuoppien pohjaa.
- Jos helmet aspiroidaan pipetin kärkiin magneettisten erotusvaiheiden aikana, annostele helmet takaisin levyn kuoppaan magneettisella jalustalla. Odota, kunnes neste on kirkasta (noin 2 minuuttia), ennen kuin jatkat toimenpiteen seuraavaan vaiheeseen.
- Helmiä pestessä:
 - Käytä levyille suositeltua magneettista jalustaa.
 - Annostele nestettä suoraan helmipelletille, jotta kuoppien sivulla olevat helmet kastuvat.

- Pidä levy magneettisella jalustalla, kunnes toimenpiteessä kehoitetaan poistamaan levy.
 - Älä ravistele levyä sen ollessa magneettisella jalustalla.
 - Älä häiritse helmipellettiä levyn ollessa magneettisella jalustalla.
- Kun helmiä pestään tai poistetaan supernatanttia, kallista pipetin kärkiä kuoppien pohjaan, jotta ei synny tyhjiötä ja jotta liuosta ei vedetä pipetin kärkien suodattimiin.

Kirjastojen määrä ja indeksien valinta

Suunnittele ennen ajon valmistelua sekvensointiajon näytekirjastojen ja näyteindeksien määrä. Seuraaviin näytemääriä koskeviin ohjeisiin sisältyvät positiiviset kontrollit, mutta negatiiviset tai templaattia sisältämättömät kontrollit (NTC:t) eivät. NTC:t on lisättävä suunniteltuun ajoon ylimääräisenä näytteenä.

Noudata TSO Comprehensive (EU):n osalta kohdissa [Taulukko 6](#) ja [Taulukko 7](#) annettua ohjeistusta, joka koskee yhdellä virtauskyvetillä sekvensoitavien RNA- ja/tai DNA-kirjastojen määrän määrittämistä. Jos sekvensoit RNA- tai DNA-kirjastoja erikseen, katso [Taulukko 6](#). Jos sekvensoit RNA- ja DNA-kirjastoja samassa virtauskyvetissä, katso [Taulukko 7](#).

Taulukko 6 RNA- tai DNA-kirjastojen sekvensointi

Kirjastotyyppi	Minimi*	Maksimi*
Vain RNA	3	16
Vain DNA	3	8

* NTC:t eivät vaikuta pleksisyyteen.

Taulukko 7 RNA- ja DNA-kirjastojen sekvensointi samassa virtauskyvetissä

Kirjastotyyppi	Minimi*	Maksimi*
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC:t eivät vaikuta pleksisyyteen.

Jotta reagenssikäyttö olisi optimaalista, kun sekvensoidaan DNA- ja RNA-kirjastoja TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä NextSeq 550Dx -laitte -laitteella, sekvensoi 8 RNA-kirjastoa ja 8 DNA-kirjastoa virtauskyvetiä kohden.

Indeksialukkeet yksilöivät jokaisen näytteen siten, että kirjastot voidaan yhdistää toisiinsa sekvensointia varten yhdessä virtauskyvetissä. Yhteensopivat indeksiyhdistelmät näkyvät Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -analyysimoduulin Create Run -näytössä ajon valmistelun aikana. Lisää indeksialuke kirjaston valmistelun yhteydessä jokaiseen näytekirjastoon. *Käytä eri indeksialukeseosta kullekin näytekirjastolle.*

Varmista, että näytteiden kanssa käyttämäsi indeksialukkeet vastaavat indeksejä, jotka valitset Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -analyysimoduulissa.

Yhteensopimattomuudet voivat saada aikaan virheellisen tulosraportoinnin johtuen positiivisen näytteen tunnistuksen menettämisestä.

TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä on kahdentyypisiä indeksejä.

- **UPxx-indeksit** — Käytä RNA- tai DNA-näytteistä johdettuihin kirjastoihin UPxx-indeksejä.
- **CPxx-indeksit** — Käytä DNA-näytteistä johdettuihin kirjastoihin CPxx-indeksejä. Älä käytä CPxx-indeksejä RNA:sta johdettuihin kirjastoihin. Niitä ei tule myöskään käyttää silloin, jos sekvensoitavia DNA-kirjastoja on vain kolme.

Jos sekvensoitavia kirjastoja on vain kolme, seuraavien vaatimusten tulee täytyä:

- Kirjastojen tulee olla kokonaan DNA- tai kokonaan RNA-kirjastoja.
- Älä käytä CPxx-indeksijoukkoja.
- Yksi seuraavista UPxx-indeksijoukoista tarvitaan riittävää monimuotoisuutta varten:
 - UP01, UP02 ja UP03
 - UP04, UP05 ja UP06
 - UP07, UP08 ja UP09
 - UP10, UP11 ja UP12

Esimerkiksi ensimmäisen kirjaston määrittäminen on UP01, toisen kirjaston määrittäminen on UP02 ja kolmannen kirjaston määrittäminen on UP03.

TruSight Oncology Kontrollit

TSO Comprehensive (EU) edellyttää TruSight Oncology Controls -kontrolleja, jotka koostuvat TruSight Oncology DNA -kontrollista ja TruSight Oncology RNA -kontrollista, joita käytetään positiivisina kontrolleina. Sisällytä TruSight Oncology DNA -kontrolli jokaiseen DNA-sekvensointiajona ja TruSight Oncology RNA -kontrolli jokaiseen RNA-sekvensointiajona tietyn kirjaston valmistelutapahtumassa (sisällytä kontrollit myös yhdistettyihin DNA- ja RNA-ajoihin). Yksilöllinen positiivinen kontrolli valmistetaan jokaiselle suunnitellulle sekvensoidulle ajolle. Katso lisätietoja asiakirjasta TruSight Oncology Controls -pakkauseloste (asiakirjanumero 200009919).

Positiivisen kontrollin syötemäärä on 40 ng DNA:lle ja RNA:lle.

Sisällytä asianmukainen NTC jokaisen RNA-kirjaston ja jokaisen DNA-kirjaston valmistelutapahtumaan. NTC sekvensoidaan toistuvasti yhden kirjaston valmistelutapahtumassa. Noudata seuraavia ohjeita TruSight Oncology Controls -kontrolleille:

- Valmistele kirjastot positiivisista kontrolleista ja templaattia sisältämättömistä kontrolleista samalla tavalla kuin näytteet.
- Käytä DNA NTC:lle TEB:tä.
- Käytä RNA NTC:lle DNAasitonta/RNAasitonta vettä.

- Positiiviset kontrollit sisältyvät maksimikirjastovaatimukseen.
- NTC:t eivät sisälly minimikirjastovaatimukseen.
- Käytä NTC:lle UP-indeksejä, kun sekvensointiin käytetään vain 3:a kirjastoa.
- Koska NTC sekvensoidaan toistuvasti, tälle kontrollille valittuja indeksejä ei voi toistaa kirjaston valmistelutapahtumassa.

Seuraavissa taulukoissa on esimerkkejä levyasetteluista kirjaston valmistelua varten. Jokainen numeroitu sarake edustaa yhtä sekvensointiajtoa. Kun DNA- ja RNA-kirjastoja sekvensoidaan yhdessä, jokainen vastaava sarakejoukko edustaa yhtä sekvensointiajtoa (esim. sarake 1 ja sarake 7). NTC sekvensoidaan jokaiselle sarakkeelle tai sarakejoukolle.

Taulukko 8 Kirjaston valmistelutapahtuma kuusi potilasnäytettä sisältävälle yksittäiselle ajolle

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pos. DNA-kontrolli	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	Pos. RNA-kontrolli
B	DNA 1	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	RNA 1
C	DNA 2	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	RNA 2
D	DNA 3	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	RNA 3
E	DNA 4	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	RNA 4
F	DNA 5	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	RNA 5
G	DNA 6	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	RNA 6
H	DNA NTC	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	tyhjä	RNA NTC

Taulukko 9 Kirjaston valmistelutapahtuma 20 potilasnäytettä sisältävälle kolmelle ajolle

	1	2	3	4	5	6	7
A	Pos. DNA-kontrolli	Pos. DNA-kontrolli	Pos. DNA-kontrolli	tyhjä	Pos. RNA-kontrolli	Pos. RNA-kontrolli	Pos. RNA-kontrolli
B	DNA 1	DNA 7	DNA 14	tyhjä	RNA 1	RNA 7	RNA 14
C	DNA 2	DNA 8	DNA 15	tyhjä	RNA 2	RNA 8	RNA 15
D	DNA 3	DNA 9	DNA 16	tyhjä	RNA 3	RNA 9	RNA 16
E	DNA 4	DNA 10	DNA 17	tyhjä	RNA 4	RNA 10	RNA 17
F	DNA 5	DNA 11	DNA 18	tyhjä	RNA 5	RNA 11	RNA 18
G	DNA 6	DNA 12	DNA 19	tyhjä	RNA 6	RNA 12	RNA 19
H	DNA NTC	DNA 13	DNA 20	tyhjä	RNA NTC	RNA 13	RNA 20

Käyttöohjeet

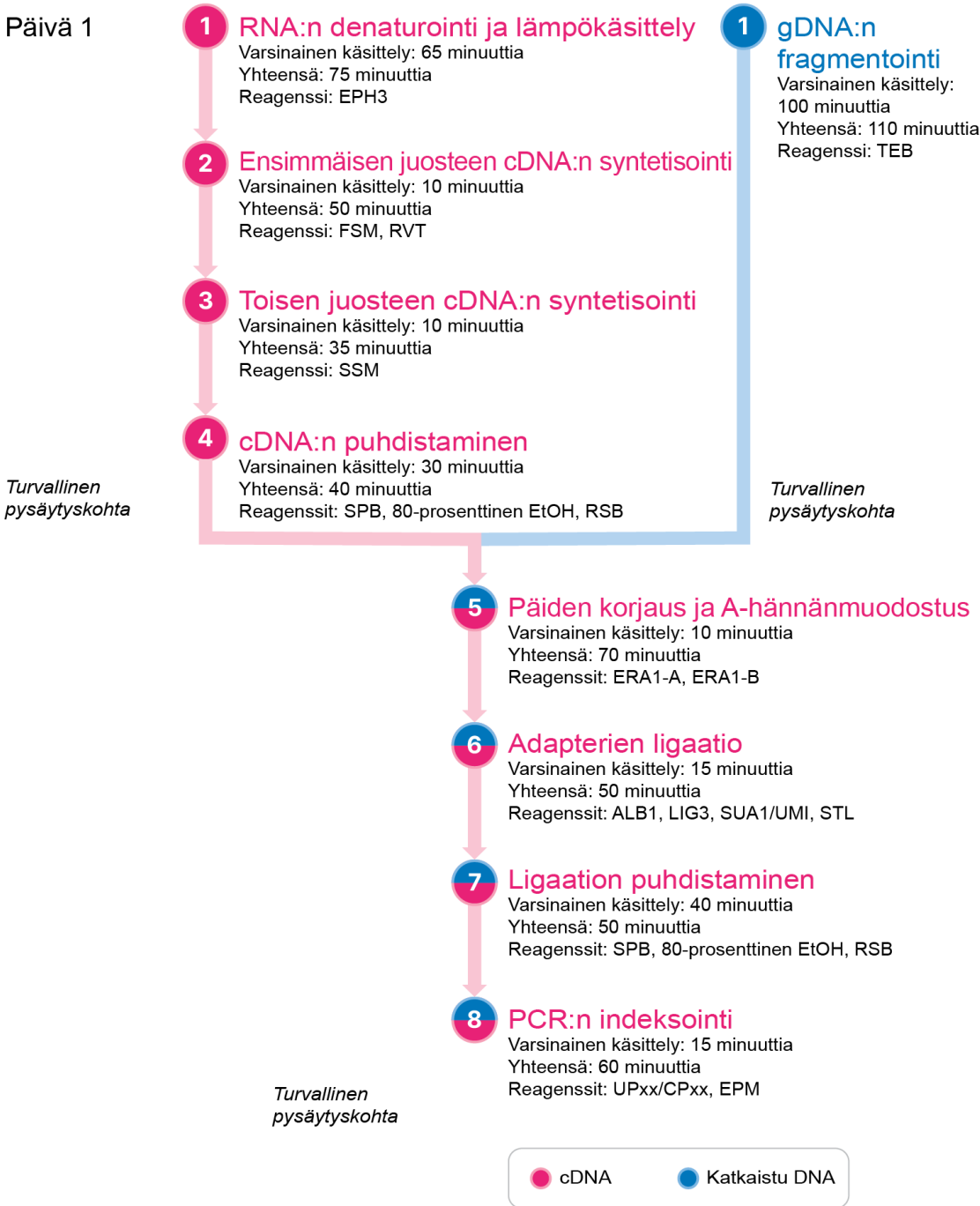
Yleiskatsaus TSO Comprehensive (EU) -työnkulusta esitetään [Kuva 1](#) ja [Kuva 2](#).

Kirjaston valmistelun työnkulku

[Kuva 1](#) esittää kirjaston valmistelun työnkulun TSO Comprehensive (EU) -määritystä varten. RNA- ja DNA-näytteistä saatavat kirjastot voidaan valmistella samanaikaisesti eri kuopissa. Käsittele positiiviset kontrollit ja templaattia sisältämättömät kontrollit samalla tavalla kuin näytteet. Turvalliset pysähdyskohdat on merkitty vaiheiden väliin.

Ennen kuin aloitat protokollan, syötä ajo- ja näytetiedot Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -analyysimoduuliin. Katso *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)*.

Kuva 1 TSO Comprehensive (EU) -työnkulku (osa 1)

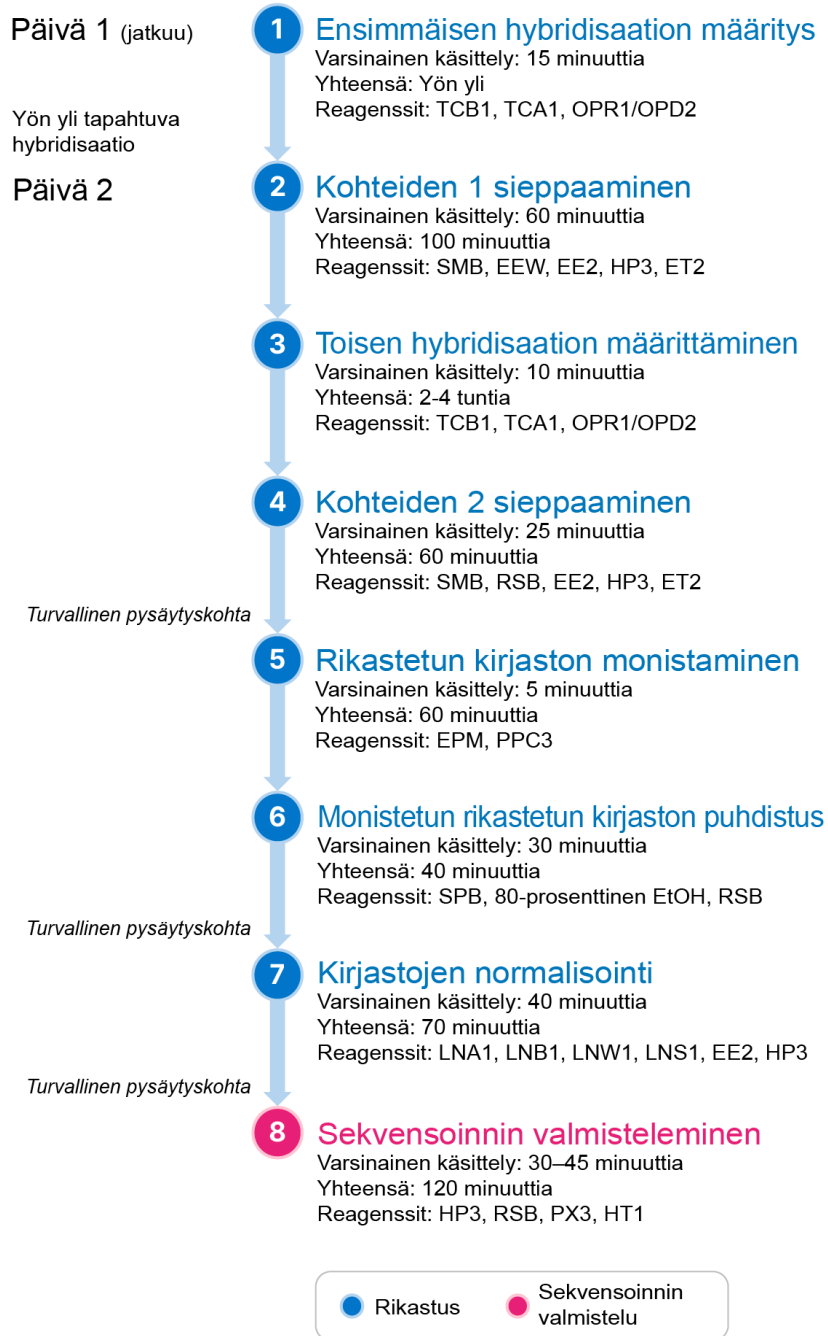


* Varsinaisen käsittelyn aika ja kokonaisaika ovat likimääräisiä.

Rikastuksen työnkulku

Kuva 2 esittää TSO Comprehensive (EU) -määrityksen rikastuksen työnkulun. Turvalliset pysähdyskohdat on merkitty vaiheiden väliin.

Kuva 2 TSO Comprehensive (EU) Työnkulku (osa 2)



PCR-laitteiden ohjelmointi

Ennen kuin aloitat määrittämisen, tallenna seuraavat ohjelmat monistusta edeltäville ja monistuksen jälkeisille PCR-laitteille.

Taulukko 10 Monistusta edeltävän PCR-laitteen ohjelmat

Menettelyvaihe	Ohjelman nimi	Kannen lämpötila	Reaktiivilavuus	PCR-laitteen parametrit
RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65 °C 5 minuutin ajan • 4 °C 1 minuutin ajan • Pidä 4 °C:ssa
Ensimmäisen juosteen cDNA:n syntetisointi	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25 °C 10 minuutin ajan • 42 °C 15 minuutin ajan • 70 °C 15 minuutin ajan • 4 °C 1 minuutin ajan • Pidä 4 °C:ssa
Toisen juosteen cDNA:n syntetisointi	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16 °C 25 minuutin ajan • 4 °C 1 minuutin ajan • Pidä 4 °C:ssa

HUOMAUTUS Jos 2ndSS-ohjelman kannen lämpötilaa ei voida asettaa 30 °C:n lämpötilaan, kytke esilämmitetyn kannen lämmitysasetus pois päältä.

Taulukko 11 Monistuksen jälkeisen PCR-laitteen ohjelmat

Menettelyvaihe	Ohjelman nimi	Kannen lämpötila	Reaktiivilavuus	PCR-laitteen parametrit
PCR:n indeksointi	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C 30 sekunnin ajan • 15 sykliä: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C 10 sekunnin ajan • 60 °C 30 sekunnin ajan • 72 °C 30 sekunnin ajan • 72 °C 5 minuutin ajan • Pidä 10 °C:ssa

Menettelyvaihe	Ohjelman nimi	Kannen lämpötila	Reaktiivilavuus	PCR-laitteen parametrit
Suorita ensimmäinen hybridisaatio	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C 10 minuutin ajan • 85 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan • 75 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan • 65 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan • Pidä 57 °C:ssa 8–24 tuntia
Suorita toinen hybridisaatio	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95 °C 10 minuutin ajan • 85 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan • 75 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan • 65 °C 2 minuutin ja 30 sekunnin ajan • Pidä 57 °C:ssa 1,5–4 tuntia
Rikastetun kirjaston monistaminen	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98 °C 30 sekunnin ajan • 18 sykliä: <ul style="list-style-type: none"> • 98 °C 10 sekunnin ajan • 60 °C 30 sekunnin ajan • 72 °C 30 sekunnin ajan • 72 °C 5 minuutin ajan • Pidä 10 °C:ssa

Valmisteleminen protokolla

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.



HUOMIO

Kaikki työnkulun toimenpiteet edellyttävät RNAasitonta/DNAasitonta ympäristöä.

1. Dekontaminoi työalueet perusteellisesti RNAasia/DNAasia estävällä puhdistusaineella.
2. Varmista, että monistusta edeltävät PCR-laitteen ohjelmat on asetettu. Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
3. Noudata ultrasonikaattorin asettamisessa valmistajan ohjeita.
4. Mikäli käsitellään ainoastaan DNA-näytteitä, siirry kohtaan [gDNA:n fragmentointi sivulla 48](#).
5. Poista RNA-kontrollit säilytyksestä.
6. Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

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

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
EPH3	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely
FSM	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Ensimmäisen juosteen cDNA:n syntetisointi
RVT	-25 – -15 °C	Pidä kylmässä.	Ensimmäisen juosteen cDNA:n syntetisointi
SSM	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Toisen juosteen cDNA:n syntetisointi

Taulukko 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
SPB (vaaleanvihreä merkintä)	2 °C – 8 °C	Anna lämmentä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	cDNA:n puhdistaminen
RSB	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	cDNA:n puhdistaminen

RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely

Tämä prosessi denaturoi puhdistetun RNA:n ja liittää siihen satunnaisten heksameerien alukkeet cDNA-synteesiä varten.

Valmisteleminen

- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EPH3 — aseta sivuun.
 - FSM — sekoita vorteksoimalla. Sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Reagenssi voi sisältää valkoisia, tuotteeseen liittyviä hiukkasia. Käyttäjän toimia ei tarvita. Ei vaikuta tuotteen suorituskykyyn.
 - RVT — sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Pidä kylmässä.

HUOMAUTUS RVT on viskoosi liuos. Minimoi kuplan muodostuminen pipetoinnin aikana.

- Yhdistä mikrosentrifugiputkessa seuraavat määrät FSM+RVT Master Mix -seoksen valmistamiseksi.

Taulukko 14 FSM + RVT Master Mix*

Master Mix -komponentti	4 kirjastoa (µl)	8 kirjastoa (µl)	16 kirjastoa (µl)	24 kirjastoa (µl)
FSM	36	72	144	216

Master Mix -komponentti	4 kirjastoa (µl)	8 kirjastoa (µl)	16 kirjastoa (µl)	24 kirjastoa (µl)
RVT	4	8	16	24

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskennat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 32](#).

- Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
- Pidä FSM+RVT Master Mix -seos kylmässä, kunnes toteutetaan menettely [Ensimmäisen juosteen cDNA:n syntetisointi sivulla 45](#).

Toimenpide

- Pidä erotetut RNA-näytteet ja RNA-kontrollit kylmässä sulatuksen aikana. Käsittele RNA-kontrolleja näytteinä protokollan lopun ajan.
- Pidä RNA kylmässä, kun sitä ei käytetä. Katso kohta [Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25](#)) näytteiden kvantifioimiseksi.
- Sekoita pipetoimalla jokaista RNA-näytettä 10 kertaa.
- Käytä RNase/DNase-free water valmistaaksesi 40 ng kutakin RNA-näytettä lopulliseen tilavuuteen 8,5 µl (4,7 ng/µl).
Käytä RNA-kontrolleissa koeputken etiketissä ilmoitettua pitoisuutta.
- Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä CF (cDNA-fragmentit).
- Lisää 8,5 µl kutakin RNA-näytettä CF PCR -levyn yksilöityyn kuoppaan.
- Varmista, että kunkin näytteen näytelevyn asettelu ja kunkin näytteen indeksit vastaavat ajon määrittämisen aikana suunniteltua TSO Comprehensive (EU) -analyysimoduulin ajoa.
- Sekoita EPH3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- Lisää 8,5 µl EPH3:a kuhunkin näytekuoppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi CF PCR -levyyn.



HUOMIO

Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.

- Ravista nopeudella 1 200 rpm 1 minuutin ajan.
- Sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
- Laita PCR-laitteeseen ja aja LQ-RNA-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
- Kun näytteet saavuttavat 4 °C:n lämpötilan, pitele niitä 1 minuutin ajan. Siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

Ensimmäisen juosteen cDNA:n syntetisointi

Tämä prosessi käänteiskopioi satunnaisilla heksameereillä esikäsitellyt RNA-fragmentit ensimmäisen juosteen cDNA:ksi käyttäen reverse transcriptase -menetelmä.

Toimenpide

1. Poista CF PCR -levy PCR-laitteesta.
2. Pipetoi 10 kertaa FSM + RVT Master Mix -seoksen sekoittamiseksi. Varmista, että FSM + RVT -seos on täysin homogeeninen.
3. Lisää 8 µl FSM+RVT Master Mix -seosta jokaiseen näytekuppaan.
4. Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
5. Hävitä jäljellä oleva FSM + RVT master mix -seos.
6. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi CF PCR -levvyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
7. Ravista nopeudella 1 200 rpm 1 minuutin ajan.
8. Sentrifugoi kiihtyvyydellä $280 \times g$ 1 minuutin ajan.
9. Aseta PCR-laitteeseen ja aja 1stSS-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
10. Kun näytteet saavuttavat 4 °C:n lämpötilan, siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen.
Ensimmäisen juosteen näytteitä voidaan säilyttää 4 °C:ssa enintään 5 minuuttia.

Toisen juosteen cDNA:n syntetisointi

Tämä prosessi poistaa RNA-templaatin ja syntetisoi kaksoisjuosteisen cDNA:n.

Valmisteleminen

1. Valmistele SSM:
 - a. Sekoita kääntelemällä 10 kertaa.
 - b. Sentrifugoi lyhyesti. Reagenssi voi sisältää valkoisia, tuotteeseen liittyviä hiukkasia. Lisätoimia ei tarvita.
Ei vaikuta tuotteen suorituskykyyn.

Toimenpide

1. Poista CF PCR -levy PCR-laitteesta.
2. Lisää 25 µl SSM:ää kuhunkin näytekuppaan.
3. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi CF PCR -levvyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
4. Ravista nopeudella 1 200 rpm 1 minuutin ajan.

- Sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
- Aseta PCR-laitteeseen ja aja 2ndSS-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
- Kun näytteet saavuttavat 4 °C:n lämpötilan, pitele yhden minuutin ajan ja siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

cDNA:n puhdistaminen

Tässä prosessissa käytetään SPB:tä cDNA:n puhdistamiseksi ei-toivotuista reaktiokomponenteista. Helmet pestään kahdesti tuoreella 80-prosenttisella EtOH:lla. cDNA eluoidaan RSB:llä.

Valmisteleminen

- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - SPB — varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
 - RSB — aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- Valmista uusi 80-prosenttinen EtOH 15 ml:n tai 50 ml:n kartiopotkeen seuraavalla tavalla.

Taulukko 15 Valmista tuoretta 80-prosenttista EtOH:ta.

Reagenssi	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa
100-prosenttinen EtOH, puhdas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- Sekoita vorteksoimalla uusi 80-prosenttinen EtOH.
- Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BIND1 (cDNA:n sidonta).
- Peitä ja aseta sivuun.
- Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

- Poista CF PCR -levy PCR-laitteesta.
- Suspendoi helmet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
- Lisää välittömästi 90 µl SPB:tä kuhunkin BIND1 MIDI -levyn näytekuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SPB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä ylimerkintäkertoimella 1,15. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SPB:tä on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
- Siirrä kunkin näytteen koko tilavuus (50 µl) CF PCR -levystä BIND1 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- Hävitä tyhjä CF PCR -levy.

- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BIND1 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- Aseta BIND1 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 5 minuutin ajaksi.
- Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

- Pese helmet seuraavasti.
 - Pidä BIND1 MIDI -levy magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl tuoretta 80-prosenttista EtOH:ta kuhunkin kuoppaan.
 - Odota 30 sekuntia.
 - Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
- Pese helmet **toisen** kerran.
- Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.
- Hävitä käyttämätön 80-prosenttinen EtOH.

Eluointi

- Irrota BIND1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
- Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
- Lisää 22 µl RSB:tä kuhunkin näytekuoppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BIND1 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
- Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
- Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä PCF (puhdistetut cDNA-fragmentit).
Jos pysäytät [TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA sivulla 48](#) mukaisessa kohdassa, käytä PCR-levyä.
- Siirrä kustakin BIND1 MIDI -levyn näytekuopasta 20 µl eluaattia PCF-levyn vastaavaan kuoppaan.
- Hävitä tyhjä BIND1 MIDI -levy.
- Lisää 30 µl RSB:tä kuhunkin PCF-levyn näytekuoppaan.
- Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
- Aseta PCF-levyyn liimapintainen levyn sulkukansi ja säilytä se kylmässä.
- Palauta EPH3, FSM, RVT ja SSM säilytykseen.

15. Jos käsittelet vain RNA:sta (cDNA) johdettuja näytteitä ja et pysähdy turvalliseen pysäytyskohtaan, jatka kohtaan [Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus sivulla 51](#).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, sentrifugoi PCF PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä lämpötilassa -25 – -15 °C enintään 7 vuorokautta.

Valmisteleminen protokolla

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

- Poista DNA-kontrollit säilytyksestä.
- Ota reagenssiputki rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
TEB	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	gDNA:n fragmentointi

gDNA:n fragmentointi

Tämä prosessi fragmentoi gDNA:n ja luo dsDNA-fragmentteja, joissa on 3'- tai 5'-ulokkeet.

Valmisteleminen

- Noudata kohdassa [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26](#)) annettuja suosituksia, jotta voit kvantifioida näytteitä.
- TEB:n valmistelu — sekoita vorteksoimalla tai kääntämällä.

Toimenpide

Levyn valmisteleminen

Valmistele levy jollakin seuraavista vaihtoehdoista:

- Käsittele gDNA-näytteet samanaikaisesti cDNA-näytteiden kanssa PCF MIDI -levyssä.
 - Merkitse PCF MIDI -levyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).
 - Pidä kylmässä ja aseta sivuun kohdan [Fragmentoidun DNA:n siirtäminen sivulla 49](#)) mukaista käyttöä varten.
- Käsittele gDNA-näytteet samanaikaisesti cDNA-näytteiden kanssa, jos PCF PCR -levy on jäädytetty.
 - Sulata PCF PCR -levy huoneenlämpötilaan.
 - Sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
 - Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
 - Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).

- e. Siirrä kunkin näytteen kaikki 50 µl PCF PCR -levystä LP MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- f. Hävitä PCF PCR -levy.
- g. Aseta liimapintainen levyn sulkukansi ja pidä kylmässä kohtaan [Fragmentoidun DNA:n siirtäminen sivulla 49](#) asti.
- Käsittele vain gDNA-näytteet.
 - a. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen). Jos pysäytät [TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA sivulla 50](#) mukaisessa kohdassa, käytä PCR-levyä.
 - b. Peitä ja aseta sivuun kohdan [Fragmentoidun DNA:n siirtäminen sivulla 49](#)) mukaista käyttöä varten.

gDNA:n laimentaminen

1. Sulata gDNA-näytteet ja DNA-kontrollit huoneenlämpötilassa.
2. Sekoita jokainen gDNA-näyte pipetoimalla 10 kertaa.
3. Kerää pisarat sentrifugoimalla putki lyhyesti.
4. Sekoita TEB vorteksoimalla tai kääntämällä.
5. Käytä TEB:tä ja valmista näyte, jonka lopullinen tilavuus on 52 µl. Katso seuraavasta taulukosta syötemäärät ja minimipitoisuudet näytetyypin mukaan.
 - Määrittäminen edellyttää erotuksen vähimmäispitoisuutta, jotta 52 µl:n tilavuuteen saadaan vähintään 40 µl TEB:tä.
 - Käytä DNA-kontrolleissa putken merkinnöissä ilmoitettua pitoisuutta.
 - Jotta näytteen menetys voidaan estää, älä pipetoi tähän laimennukseen alle 2 µl:n näytettä.

Näytteen tyyppi	Syötemäärä (ng)	Minimipitoisuus (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrolli	40	Katso putken merkintä

Fragmentointi

1. Lisää 52 µl kutakin gDNA-näytettä sonikaattorin putken erilliseen kuoppaan.



HUOMIO

Lisää gDNA putkeen hitaasti, varmistaen, että putken alaosassa ei ole ilmarakoja. Lisätietoja on kohdassa [Määrittäminen sivulla 28](#) sekä valmistajan ohjeissa.

2. Kirjaa muistiin liuskan suunta.
3. Fragmentoi gDNA fragmentteihin ultrasonikaattorilla.

Fragmentoidun DNA:n siirtäminen

1. Varmista, että kunkin näytteen näytelevyn asettelu ja indeksit vastaavat ajoa, jonka valitset analysoitavaksi TSO Comprehensive (EU) -analyysimoduulilla -työkalulla.

- Ota näyte talteen noudattamalla ultrasonikaattorin valmistajan ohjeita. Joissakin ultrasonikaattorin putkityypeissä tarvitaan sentrifugointia, jotta näyte saadaan tiivistettyä putkessa.
- Siirrä jokaisesta fragmentoidusta gDNA-näytteestä ohutkärkisellä pipetillä kolme kertaa 16,7 µl LP MIDI -levyn tyhjään kuoppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP MIDI -levyyn.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, kiinnitä LP PCR -levyyn liimapintainen sulkukansi ja sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan. Säilytä lämpötilassa -25 – -15 °C enintään 7 vuorokautta.

Valmisteleminen protokolla

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysäytymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

Varmista, että monistuksen jälkeiset PCR-laitteen ohjelmat on asetettu. Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).

- Valmistele jääastia tai vastaava.
- Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (PN 20031118)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
ERA1-A	-25 – -15 °C	Pidä kylmässä.	Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus
ERA1-B	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus
ALB1	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Adapterien ligaatio
LIG3	-25 – -15 °C	Pidä kylmässä.	Adapterien ligaatio
SUA1 (sininen korkki)	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Adapterien ligaatio
UMI (valkoinen korkki)	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Adapterien ligaatio
STL	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Adapterien ligaatio
EPM	-25 – -15 °C	Pidä kylmässä.	PCR:n indeksointi

Taulukko 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (PN 20031119)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
SPB (vaaleanvihreä merkintä)	2 °C – 8 °C	Anna lämmitä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	Ligaation puhdistaminen
RSB	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Ligaation puhdistaminen

Taulukko 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (PN 20031120)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
UPxx	-25 – -15 °C	Sulata asianmukaiset indeksialukeputket huoneenlämpötilaan.	PCR:n indeksointi

Taulukko 20 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (PN 20031126)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
CPxx	-25 – -15 °C	Sulata asianmukaiset indeksialukeputket huoneenlämpötilaan.	PCR:n indeksointi

Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus

Tässä prosessissa fragmentoinnin seurauksena syntyneet ulokkeet muutetaan A-häntäulokkeelliseksi päiksi käyttämällä End Repair A-Tailing master mix (ERA1) -seosta.

Tämän seoksen eksonukleaasiaktiivisuus 3'-suunnasta 5'-suuntaan poistaa 3'-ulokkeet ja polymeraasiaktiivisuus 5'-suunnasta 3'-suuntaan täyttää 5'-ulokkeet. Tämän reaktion aikana 3'-päihin muodostetaan A-häntä, jotta estetään niiden ligaatio toisiinsa adapterin ligaatioreaktion yhteydessä.

Valmisteleminen

- Esilämmitä 2 MIDI-lämpöblokkisisäosilla varustettua mikronäyteinkubaattoria seuraavasti.
 - Esilämmitä mikronäyteinkubaattori 30 °C:n lämpötilaan.
 - Esilämmitä mikronäyteinkubaattori 72 °C:n lämpötilaan.
- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - ERA1-A — sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Pidä kylmässä.
 - ERA1-B — sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
Tarkista saostumien varalta. Jos niitä näkyy, lämmitä putki 37 °C:n lämpötilaan. Sekoita sitten pipetoimalla, kunnes saostumat ovat liuenneet.

3. Valmista ERA1 Master Mix -seos mikrosentrifugiputkessa.

Taulukko 21 ERA1 Master Mix*

Master Mix -komponentti	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
ERA1-B	35 µl	69 µl	138 µl	207 µl	415 µl
ERA1-A	13,5 µl	27 µl	54 µl	81 µl	161 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskennat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 32](#).

4. Sekoita pipetoimalla hitaasti 10 kertaa homogeenisuuden varmistamiseksi, ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyesti. Pidä ERA1 master mix -seos kylmässä.
5. Valmistele levy valitsemalla jokin seuraavista vaihtoehdoista:
- Jos näytteet ovat MIDI-levyssä, valmistele seuraavasti.
 - a. Merkitse MIDI-levyyn uudelleen merkinnällä LP2 (kirjaston valmisteleminen 2).
 - b. Jos jotkin näytteet ovat erillisissä MIDI-levyissä, siirrä kaikki näytteet saman MIDI-levyn erillisiin kuoppiin levyasettelun mukaan.
 - Jos levy on jäänyt, valmistele se seuraavasti.
 - a. Sulata PCF PCR -levy tai LP PCR -levy huoneenlämpötilaan.
 - b. Sentrifugoi levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
 - c. Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
 - d. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP2 (kirjaston valmisteleminen 2).
 - e. Siirrä kunkin näytteen kaikki 50 µl PCF PCR -levystä tai LP PCR -levystä LP2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
 - f. Hävitä PCF PCR- tai LP PCR -levy.

Toimenpide

1. Lisää 10 µl ERA1 Master Mix -seosta kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuppaan.
2. Hävitä jäljelle jäävä ERA1 Master Mix -seos.
3. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
4. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
5. Inkuboi 30 °C:n lämpötilaan esilämmitetyssä mikronäyteinkubaattorissa 30 minuuttia.
6. Siirrä välittömästi toiseen esilämmitettyyn mikronäyteinkubaattoriin.
7. Inkuboi 72 °C:n lämpötilassa 20 minuuttia.
8. Pidä LP2 MIDI -levy kylmässä 5 minuutin ajan.

Adapterien ligaatio

Tässä prosessissa liitetään adapterit cDNA- ja/tai gDNA-fragmenttien päihin.

TSO Comprehensive (EU) -määritys sisältää SUA1- ja UMI-adapterit.

- Käytä SUA1-adapttereita RNA-näytteiden kanssa.
- Käytä UMI-adapttereita DNA-näytteiden kanssa.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - ALB1 — Sekoita vähintään 10 sekuntia vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - LIG3 — Sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Pidä kylmässä.
 - SUA1 — Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - UMI — Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - STL — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.

Toimenpide

1. Poista LP2 MIDI -levy jäistä tai vastaavasta.
2. Lisää 60 µl ALB1:tä kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuppaan. ALB1 on viskoosi liuos. Pipetoi hitaasti kuplien muodostumisen minimoimiseksi.
3. Lisää 5 µl LIG3:a kuhunkin näytekuppaan.
4. Lisää adapterit seuraavasti.

Älä yhdistä erityyppisiä adapttereita toisiinsa.

 - **[RNA-näytekupat]** — Lisää 10 µl SUA1:tä (sininen korkki) jokaiseen RNA:sta peräisin olevaan näytteeseen.
 - **[DNA-näytekupat]** — Lisää 10 µl UMI:a (valkoinen korkki) jokaiseen DNA:sta peräisin olevaan näytteeseen.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Inkuboi huoneenlämmössä 30 minuuttia.
8. Sekoita STL vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
9. Lisää 5 µl STL:ää kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuppaan.
10. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
11. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.

Ligaation puhdistaminen

Tässä prosessissa poistetaan ei-toivotut tuotteet ja käytetään SPB:tä adapteriin liitettyjen cDNA- tai gDNA-fragmenttien puhdistamiseksi. Helmet pestään kahdesti tuoreella 80-prosenttisella etanolilla. Adapteriin liitetyt näytteet elutoidaan RSB:llä.

Valmisteleminen

- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - SPB — Varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
 - RSB — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- Valmista uusi 80-prosenttinen EtOH 15 ml:n tai 50 ml:n kartioputkeen.

Taulukko 22 Valmista tuoretta 80-prosenttista etanolia.

Reagenssi	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
100-prosenttinen EtOH, puhdas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Sekoita vorteksoimalla uusi 80-prosenttinen EtOH.
- Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

- Suspendoi helmet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
- Lisää välittömästi 112 µl SPB:tä kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuppaan.
Jos käytät kaukaloa SPB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohmainen materiaalmäärä ylimerkintäkertoimella 1,15. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SPB:tä on lisätty kuhunkin näytekuppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- Aseta LP2 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 10 minuutin ajaksi.
- Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekupasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

1. Pese helmet seuraavasti.
 - a. Pidä LP2 MIDI -levy magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl uutta 80-prosenttista EtOH:ta kuhunkin näytekuoppaan.
 - b. Odota 30 sekuntia.
 - c. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet **toisen** kerran.
3. Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.
4. Hävitä käyttämätön 80-prosenttinen EtOH.

Eluointi

1. Irrota LP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
3. Lisää 27,5 µl RSB:tä kuhunkin näytekuoppaan.
4. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
5. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
6. Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
7. Aseta LP2 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
8. Tee uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä LS (kirjastonäytteet).
9. Siirrä LP2 MIDI -levystä 25 µl kutakin eluaattia LS PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
10. Hävitä tyhjä LP2 MIDI -levy.

PCR:n indeksointi

Tässä vaiheessa kirjastofragmentteja monistetaan käyttämällä alukkeita, jotka lisäävät indeksisekvenssejä näytteen multipleksointiin. Aikaansaatu tuote sisältää cDNA:n koko kirjaston ja/tai DNA-fragmentit, joiden vieressä on klusterin luontiin tarvittavat adapterit.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EPM — Pidä kylmässä.
 - UPxx — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti. UPxx on indeksialuke, joka valitaan Local Run Manager -ohjelmiston Create Run (Luo ajo) -näytöllä ajon käyttöönoton aikana.
 - CPxx — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti. CPxx on indeksialuke, joka valitaan Local Run Manager -ohjelmiston Create Run (Luo ajo) -näytöllä ajon käyttöönoton aikana.

2. Varmista, että kunkin näytteen indeksit vastaavat ajoa, joka suunniteltiin TSO Comprehensive (EU) -analyysimoduulissa -ohjelmistossa ajon asetusten aikana. Varmista, että noudatat indeksin valinnan ohjeita, jotka löytyvät kohdasta [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 34](#).

**HUOMIO**

Näytteiden ja indeksialukkeiden yhteensopimattomuudet voivat saada aikaan virheellisen tulosraportoinnin johtuen positiivisen näytteen tunnistuksen menettämisestä.

Toimenpide

1. Lisää 5 µl sopivaa indeksialuketta (UPxx tai CPxx) vastaavaan näytekuoppaan LS PCR -levylle valittujen indeksien mukaisesti.

**HUOMIO**

Käsittele ja avaa vain yksi indeksialukeputki kerrallaan. Aseta kullekin indeksiputkelle uusi korkki paikoilleen heti käytön jälkeen. Älä yhdistele indeksialukkeita toisiinsa.

2. Sekoita EPM vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Lisää 20 µl EPM:ää kuhunkin näytekuoppaan.
4. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LS PCR -levvyyn. Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
5. Ravista nopeudella 1 200 rpm 1 minuutin ajan.
6. Palauta monistusta edeltävät reagenssit säilytykseen.

**HUOMIO**

Suorita kaikki seuraavat vaiheet monistuksen jälkeisellä alueella monistustuotteen siirtymisen estämiseksi.

7. Sentrifugoi LS PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
8. Aseta esiohjelmoituun monistuksen jälkeiseen PCR-laitteeseen ja aja I-PCR-ohjelma. Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#). Jos jatkat kohtaan [Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen sivulla 57](#), noudata Protokollavaiheiden valmisteleminen -kohdan reagensseja koskevia ohjeita.
9. Kun I-PCR-ohjelma on valmis, sentrifugoi LS PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
10. Merkitse levyyn uudelleen merkintä ALS (monistetut kirjastonäytteet).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, säilytä ALS PCR -levyä lämpötilassa -25 – -15 °C enintään 30 päivän ajan.

Valmisteleminen protokollaan

Valmisteluja tarvitaan yön yli tapahtuvaa hybridisointia edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

1. Varmista, että monistuksen jälkeiset PCR-laitteen ohjelmat on asetettu. Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
2. Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
TCB1	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Taulukko 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
TCA1	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Taulukko 25 TruSight Oncology Comp Content Set Box (PN 20031122)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
OPR1 (punainen korkki)	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen
OPD2 (valkoinen korkki)	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

Tässä prosessissa oligojen pooli hybridisoituu cDNA-kirjastoihin ja oligojen pooli hybridisoituu gDNA-kirjastoihin, jotka on valmisteltu kohdan [PCR:n indeksointi sivulla 55](#). Kohdealueiden rikastus vaatii kaksi hybridisaatiovaihetta. Ensimmäisessä hybridisaatiossa oligot hybridisoituvat cDNA- ja/tai gDNA-kirjastoihin yön yli (8–24 tuntia).

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - TCB1 — Lämmitä putkea 37 °C:n lämpötilassa 5 minuuttia. Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - TCA1 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - OPR1 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

- OPD2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
2. Jos ALS PCR -levy on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan. Sekoita pipetoimalla.
 3. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä HYB1 (hybridisaatio 1).

Toimenpide

1. Siirrä kustakin ALS PCR -levyn cDNA- ja/tai gDNA-kirjastosta 20 µl HYB1-PCR-levyn vastaavaan kuoppaan.
2. Aseta ALS PCR -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi ja aseta se sivuun. Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
3. Tarkista TCB1 saostumien varalta. Jos niitä näkyy, lämmitä putki uudelleen ja vorteksoi putkea, kunnes kiteet liukenevat.
4. Lisää 15 µl TCB1:tä kuhunkin HYB1-PCR-levyn kirjastokuoppaan.
5. Lisää 10 µl TCA1:tä kuhunkin HYB1-PCR-levyn kirjastokuoppaan.
6. Lisää koettimet.
Älä yhdistä erilaisia koetintyyppisiä toisiinsa. Lisää vain yksi koetinjoukko kuoppaa kohti.
 - **[RNA-kirjastokuopat]** — Lisää 5 µl OPR1:tä (punainen korkki) kuhunkin RNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
 - **[DNA-kirjastokuopat]** — Lisää 5 µl OPD2:ta (valkoinen korkki) kuhunkin DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
7. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi HYB1-PCR-levyyn. Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
8. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
9. Aseta PCR-laitteeseen ja aja HYB1-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
10. Hybridisoi 57 °C:n lämpötilassa vähintään 8 ja enintään 24 tunnin ajan.
11. Palauta hybridisaatioreagenssit säilytykseen.
12. Säilytä ALS PCR -levy -25 °C:n ja -15 °C:n välillä enintään 30 päivää.

Valmisteleminen protokolla

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

Ota päivän 2 alussa reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
SMB (tummansininen merkintä)	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen
ET2	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen
HP3	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen Kirjastojen normalisointi
TCB1	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen
RSB	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kohteiden 2 sieppaaminen Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus

Taulukko 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
EE2	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen Kirjastojen normalisointi
EEW	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Kohteiden 1 sieppaaminen
TCA1	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen

Taulukko 28 TruSight Oncology Comp Content Set Box (PN 20031122)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
OPR1 (punainen korkki)	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen
OPD2 (valkoinen korkki)	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Toisen hybridisaation määrittäminen

Kohteiden 1 sieppaaminen

Tässä vaiheessa käytetään SMB:tä kohdealueille hybridisoituneiden koettimien sieppaamiseen. Helmet pestään kolme kertaa EEW:llä. Rikastetut kirjastot eluoidaan uudella EE2+HP3 Elution Mix -seoksella ja neutraloidaan ET2:lla.

Valmisteleminen

1. Esilämmitä MIDI-lämpöblokkisäosilla varustettu mikronäyteinkubaattori 57 °C:n lämpötilaan.
2. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EEW — Sekoita vorteksoimalla 1 minuutin ajan.
 - EE2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - HP3 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - SMB — Varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan. Varmista, että tähän toimenpiteeseen käytetään **SMB:tä**, ei SPB:tä.
 - ET2 — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
3. Valmista uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos mikrosentrifugiputkeen.

Taulukko 29 EE2+HP3 Elution Mix kohteiden 1 sieppaamiseen*

Elution Mix - komponentti	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskennat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 32](#).

4. Vorteksoi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Aseta sivuun [Eluointi sivulla 61](#)) varten.
5. Merkitse uusi 96 kuopan MIDI-levy merkinnällä CAP1 (sieppaus 1).
6. Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

1. Poista HYB1 PCR -levy PCR-laitteesta.
2. Sentrifugoi HYB1 PCR -levy kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
3. Vorteksoi SMB:tä 1 minuutin ajan helmien uudelleensuspendoimiseksi.
Jos löydät saostumia tai helmipellettejä, varmista että huoneenlämpötila saavutetaan, ja pipetoi ylös ja alas pellettien vapauttamiseksi. Vorteksoi lopuksi pellettien uudelleensuspendoimiseksi.
4. Lisää välittömästi 150 µl SMB:tä jokaiseen CAP1 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SMB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaolimäärä kertoimella 1,15, jotta materiaalia on riittävästi.
5. Hävitä jäljelle jäänyt materiaali sen jälkeen, kun SMB on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
6. Aseta pipetti 50 µl:aan ja siirrä kunkin kirjaston koko määrä HYB1 PCR -levyltä CAP1 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
7. Hävitä tyhjä HYB1 PCR -levy.

8. Lisää CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
9. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
10. Inkuboi esilämmitetyssä mikroinkubaattorissa 57 °C:n lämpötilassa 25 minuutin ajan.
11. Aseta CAP1 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
12. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekupasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.



HUOMIO

Siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen ([Pesu sivulla 61](#)). Älä jätä helmipellettiä pitkäksi aikaa kuivaksi nesteettä.

Pesu

1. Pese helmet seuraavasti.
 - a. Poista CAP1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
 - b. Lisää kuhunkin kuoppaan 200 µl EEW:tä.
 - c. Käytä pipettiä, jonka tilavuudeksi on asetettu 150 µl, ja sekoita pipetoimalla vähintään 10 kertaa.
Varmista, että kaikki helmet suspendoidaan uudelleen.
Varmista, että helmipellettejä ei ole läsnä, aspiroimalla varoen kuopan koko helmiliuos kärkeen. Tarkasta kunkin kuopan pohja silmämääräisesti. Jos helmipelletti löytyy, kallista pipetin kärkeä pellettiä kohden pesuvaiheiden aikana, jotta pelletti irtoaa. Varmista, että helmipelletti on täysin upotettuna liuokseen. Liuoksen tulisi näyttää tummanruskealta ja sen koostumuksen tulisi olla homogeenistä.
 - d. Lisää CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
 - e. Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
 - f. Ravista nopeudella 1 800 rpm 4 minuutin ajan.
 - g. Inkuboi mikronäyteinkubaattorissa 57 °C:n lämpötilassa 5 minuuttia.
 - h. Aseta CAP1 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
 - i. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekupasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet **toisen** kerran.
3. Pese helmet **kolmannen** kerran.
4. Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EEW-jäämät jokaisesta kuopasta.

Eluointi

1. Poista CAP1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Lisää varoen 17 µl EE2+HP3 Elution Mix -seosta kuhunkin CAP1 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.

4. Hävitä jäljelle jäänyt EE2+HP3 Elution Mix.
5. Lisää CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä ELU1 (Eluointi 1).
9. Sekoita ET2 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
10. Lisää 5 µl ET2:tä kuhunkin vastaavaan uuden ELU1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
11. Siirrä varoen 15 µl eluaattia kustakin CAP1 MIDI -levyn kirjastokuopasta ELU1 PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
12. Hävitä tyhjä CAP1 MIDI -levy.
13. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU1 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
14. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
15. Palauta EEW säilöön.

Toisen hybridisaation määrittäminen

Tässä vaiheessa rikastettujen cDNA- ja/tai gDNA-kirjastojen kohdealueet sidotaan sieppauskoettimilla toisen kerran. Toisella hybridisaatiolla varmistetaan siepattujen alueiden korkea spesifisyys. Voit varmistaa kirjastojen optimaalisen rikastuksen suorittamalla toisen hybridisaatiovaiheen 57 °C:n lämpötilassa vähintään 1,5 tunnin ja enintään 4 tunnin ajan.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - TCB1 — Lämmitä putkea 37 °C:n lämpötilassa 5 minuuttia. Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - TCA1 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - OPR1 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - OPD2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Toimenpide

1. Tarkista TCB1 saostumien varalta. Jos näkyy kiteitä, lämmitä putki uudelleen ja vorteksoi, kunnes kiteet liukenevat.
2. Lisää 15 µl TCB1:tä kuhunkin ELU1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
3. Lisää 10 µl TCA1:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.

- Lisää kuhunkin kuoppaan sama koetin, jota käytettiin ensimmäisen hybridisaatiovaiheen aikana. Lisää vain yksi koetinjoukko kuoppaa kohti.
Älä yhdistä erilaisia koetintyyppjä toisiinsa.
 - [RNA-kirjastokuopat]** — Lisää 5 µl OPR1:tä (punainen korkki) kuhunkin RNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
 - DNA-kirjastokuopat** — Lisää 5 µl OPD2:ta (valkoinen korkki) kuhunkin DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU1 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
- Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
- Laita PCR-laitteeseen ja aja HYB2-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
- Hybridisoi 57 °C:n lämpötilassa vähintään 1,5 ja enintään 4 tunnin ajan.
- Palauta hybridisaatioreagenssit säilytykseen.

Kohteiden 2 sieppaaminen

Tässä vaiheessa käytetään SMB:tä kohdealueille hybridisoituneiden koettimien sieppaamiseen. Helmet pestään kerran RSB:llä. Rikastetut kirjastot eluoidaan uudella EE2+HP3 Elution Mix -seoksella ja neutraloidaan ET2:lla.

Valmisteleminen

- Esilämmitä MIDI-lämpöblokkisäosilla varustettu mikronäyteinkubaattori 57 °C:n lämpötilaan.
- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EE2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - HP3 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - SMB — Varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan.
Varmista, että tähän toimenpiteeseen käytetään **SMB**:tä, ei SPB:tä.
 - RSB — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
 - ET2 — Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- Valmista uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos mikrosentrifugiputkeen.

Taulukko 30 EE2+HP3 Elution Mix kohteiden 2 sieppaamiseen*

Elution Mix - komponentti	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1 368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskennat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 32](#).

4. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Aseta sivuun [Eluointi sivulla 65](#)) varten.
5. Merkitse uusi 96 kuopan MIDI-levy merkinnällä CAP2 (sieppaus 2).
6. Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

1. Poista ELU1 PCR -levy PCR-laitteesta.
2. Sentrifugoi ELU1 PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
3. Vorteksoi SMB:tä 1 minuutin ajan helmien uudelleensuspendoimiseksi.
Jos löydät saostumia tai helmipellettejä, varmista että huoneenlämpötila saavutetaan, ja pipetoi ylös ja alas pellettien vapauttamiseksi. Vorteksoi lopuksi pellettien uudelleensuspendoimiseksi.
4. Lisää välittömästi 150 µl SMB:tä jokaiseen CAP2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SMB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä kertoimella 1,15, jotta materiaalia on riittävästi.
5. Hävitä jäljelle jäänyt materiaali sen jälkeen, kun SMB on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
6. Aseta pipetti 50 µl:aan ja siirrä kunkin kirjaston koko määrä ELU1 PCR -levyltä CAP2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
7. Hävitä tyhjä ELU1 PCR -levy.
8. Lisää CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
9. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
10. Inkuboi mikronäyteinkubaattorissa 57 °C:n lämpötilassa 25 minuutin ajan.
Mikäli jatkat kohtaan [Rikastetun kirjaston monistaminen sivulla 67](#)), noudata [Valmisteleminen protokollaan](#) - osiossa annettuja reagenssien sulatusohjeita.
11. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
12. Pidä CAP2 MIDI -levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.



HUOMIO

Siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen ([Pesu sivulla 64](#)). Älä jätä helmipellettiä pitkäksi aikaa kuivaksi nesteettä.

Pesu

1. Poista CAP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
3. Lisää kuhunkin kuoppaan 200 µl RSB:tä.
4. Lisää CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.

Sulje reunat ja kuopat kokonaan.

5. Ravista nopeudella 1 800 rpm 4 minuutin ajan.
6. Aseta levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
7. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
8. Poista ohutkärkisellä pipetillä RSB-jäät jokaisesta kuopasta.

Eluointi

1. Poista CAP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Lisää 22 µl EE2+HP3 Elution Mix -seosta kuhunkin CAP2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
4. Hävitä jäljelle jäänyt EE2+HP3 Elution Mix.
5. Lisää CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä ELU2 (Eluointi 2).
9. Sekoita ET2 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
10. Lisää 5 µl ET2:ta kuhunkin vastaavaan uuden ELU2 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
11. Siirrä varoen 20 µl eluaattia kustakin CAP2 MIDI -levyn kirjastokuopasta ELU2 PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
12. Hävitä tyhjä CAP2 MIDI -levy.
13. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU2 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
14. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
15. Palauta SMB, EE2, HP3, RSB ja ET2 säilytykseen.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, sentrifugoi ELU2 PCR -levyä kiihtyvyydellä $280 \times g$ 1 minuutin ajan ja säilytä lämpötilassa $-25...-15$ °C enintään 7 päivän ajan.

Valmisteleminen protokolla

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

1. Valmistele jääastia tai vastaava.
2. Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
PPC3	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Rikastetun kirjaston monistaminen
EPM	-25 – -15 °C	Pidä kylmässä.	Rikastetun kirjaston monistaminen

Taulukko 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
SPB (vaaleanvihreä merkintä)	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus
RSB	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus Sekvensoinnin valmisteleminen

Rikastetun kirjaston monistaminen

Rikastettujen kirjastojen monistamiseen käytetään tässä vaiheessa alukkeita.

Valmisteleminen

1. Jos ELU2-levy on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.

Toimenpide

1. Sekoita PPC3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
2. Lisää 5 µl PPC3:a jokaiseen ELU2 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
3. Sekoita EPM vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
4. Lisää 20 µl EPM:ää jokaiseen kirjastokuoppaan.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU2 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
6. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta PCR-laitteeseen ja aja EL-PCR-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
Jos jatkat kohdan [Kirjastojen normalisointi sivulla 70](#)) mukaisesti, noudata [Valmisteleminen protokollaan](#) -kohdan sulatusta koskevia ohjeita.
8. Palauta PPC3 ja EPM säilytykseen.

Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus

Tässä vaiheessa käytetään SPB:tä rikastettujen kirjastojen puhdistamiseen ei-toivotuista reaktiokomponenteista. Helmet pestään kahdesti tuoreella 80-prosenttisellä etanolilla. Kirjastot eluoidaan RSB:llä.

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - SPB — varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Muista käyttää toimenpiteessä **SPB:tä**, ei **SMB:tä**.
 - RSB — aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
2. Valmista uusi 80-prosenttinen etanoli 15 ml:n tai 50 ml:n kartiopotkeen.

Taulukko 33 Valmista tuoretta 80-prosenttista etanolia.

Reagenssi	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
100-prosenttinen EtOH, puhdas	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Sekoita vorteksoimalla uusi 80-prosenttinen EtOH.
- Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BIND2 (sidonnan puhdistus).
- Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

- Poista ELU2 PCR -levy PCR-laitteesta.
- Sentrifugoi ELU2 PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
- Suspendoi helmet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
- Lisää välittömästi 110 µl SPB:tä kuhunkin BIND2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
- Siirrä kustakin ELU2 PCR -levyn kirjastosta 50 µl BIND2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- Hävitä tyhjä ELU2 PCR -levy.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BIND2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- Aseta BIND2 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 5 minuutin ajaksi.
- Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

- Pese helmet seuraavasti.
 - Pidä BIND2 MIDI -levy magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl tuoretta 80-prosenttista EtOH:ta kuhunkin kuoppaan.
 - Odota 30 sekuntia.
 - Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
- Pese helmet **toisen** kerran.
- Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.

- Hävitä käyttämätön 80-prosenttinen EtOH.

Eluointi

- Irrota BIND2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
- Sekoita RSB vorteksoimalla tai kääntämällä.
- Lisää 32 µl RSB:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BIND2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
- Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
- Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä PL (puhdistetut kirjastot).
- Siirrä BIND2 MIDI -levystä 30 µl kutakin eluaattia PL PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
- Hävitä tyhjä BIND2 MIDI -levy.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi PL PCR -levyyn.
- Palauta SPB ja RSB säilytykseen.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, sentrifugoi PL PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä lämpötilassa -25 – -15 °C enintään 30 päivän ajan.

Valmisteleminen protokollaan

Valmisteluja tarvitaan seuraavaa turvallista pysähtymispistettä edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

- Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
LNA1	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi
EE2	-25 – -15 °C	Sulata huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi

Taulukko 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
LNB1	2 °C – 8 °C	Anna lämmetä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan.	Kirjastojen normalisointi

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
HP3	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi Sekvensoinnin valmisteleminen
LNW1	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi
LNS1	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Kirjastojen normalisointi

2. Jos jatkat samana päivänä kohdasta [Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 73](#)), noudata [Valmisteleminen protokollaan](#) -osion sulatusohjeita.

Kirjastojen normalisointi

Tämä prosessi käyttää LNB1:tä sekä lisäaineita (LNA1) kunkin kirjaston määrän normalisoimiseksi, jotta kirjaston edustus olisi tasaisempi poolatuissa kirjastoissa. Helmet pestään kahdesti LNW1:llä. Kirjastot eluoidaan uudella EE2+HP3 Elution Mix -seoksella ja neutraloidaan LNS1:llä.

Valmisteleminen

- Valmistele seuraavat reagenssit.
 - LNB1 — Varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
 - LNA1 — Sekoita vorteksoimalla.
 - EE2 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - HP3 — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - LNW1 — Sekoita vorteksoimalla. Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
 - LNS1 — Sekoita vorteksoimalla. Aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
- Suspendoi helmet uudelleen vorteksoimalla LNB1:tä 1 minuutin ajan. Kääntelee LNB1-putkea ja varmista, että kaikki helmet ovat suspendoituneet uudelleen.
- Pipetoi LNB1:tä ylös ja alas 10 kertaa pipetillä, jonka arvoksi on asetettu 800 µl, uudelleensuspension varmistamiseksi.
- Valmista välittömästi uusi LNA1+LNB1 Master Mix -seos kartioputkeen.



HUOMIO

Suspendoi kokonaan uudelleen LNB1-putken pohjalla oleva helmipelletti, jotta epäyhdenmukainen klusteritiheys voidaan estää.

Taulukko 36 LNA1+LNB1 Master Mix* -seos

Master Mix -komponentti	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskennat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 32](#).

- Vorteksoi LNA1 + LNB1 Master Mix -seos. Aseta sivuun [Sidonta sivulla 71](#)) varten.
- Valmista uusi EE2 + HP3 Elution Mix -seos mikrosentrifugin putkessa.

Taulukko 37 EE2 + HP3 Elution Mix -seos kirjastojen normalisoimiseen*

Elution Mix - komponentti	4 kirjastoa	8 kirjastoa	16 kirjastoa	24 kirjastoa	48 kirjastoa
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

* Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskennat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 32](#).

- Vorteksoi uusi Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Aseta sivuun [Eluointi sivulla 72](#)) varten.
- Jos PL PCR -levyä on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan. Sekoita pipetoimalla.
- Tee uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BBN (helmipohjainen normalisointi).
- Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

- Vorteksoi LNA1+LNB1 Master Mix -seos.
- Lisää välittömästi 45 µl LNA1+LNB1 Master Mix -seosta kuhunkin BBN MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
- Hävitä jäljelle jäävä LNA1+LNB1 Master Mix -seos.
- Lisää kustakin PL PCR -levyn kirjastosta 20 µl BBN MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BBN MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 30 minuutin ajan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi PL PCR -levyyn ja palauta säilytykseen.
- Aseta BBN MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

- Pese helmet seuraavasti.
 - Irrota BBN MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
 - Lisää 45 µl LN1:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.
 - Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BBN MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.

- d. Ravista nopeudella 1 800 rpm 5 minuutin ajan.
 - e. Aseta BBN MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
 - f. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet *toisen* kerran.
 3. Poista ohutkärkisellä pipetillä supernatanttijäämät jokaisesta kuopasta.

Eluointi

1. Irrota BBN MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Lisää 32 µl EE2+HP3-liuosta kuhunkin BBN MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
4. Hävitä jäljelle jäänyt Elution Mix -seos.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BBN MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Tee uuteen 96-kuoppaiseen PCR-levyyn merkintä NL (normalisoidut kirjastot).
9. Siirrä varovasti BBN MIDI -levyn kustakin kirjastokuopasta 30 µl eluaattia NL PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.



HUOMIO

Jos helmet ovat aspiroituneet pipetin kärkiin, jaa helmet takaisin magneettisessa jalustassa olevaan levyyn ja odota, kunnes neste on kirkasta (~2 minuuttia). Jatka vasta tämän jälkeen toimenpiteen seuraavaan vaiheeseen.

10. Hävitä tyhjä BBN MIDI -levy.
11. Sekoita LNS1 vorteksoimalla.
12. Lisää 30 µl LNS1:tä kuhunkin NL PCR -levyn kirjastokuoppaan.
13. Sekoita pipetoimalla viisi kertaa.
14. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi NL PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
15. Palauta LNB1, LNA1, EE2, LNW1 ja LNS1 säilytykseen.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, sentrifugoi NL PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä lämpötilassa -25...-15 °C enintään 32 päivän ajan.

Valmisteleminen protokollaan

Valmisteluja tarvitaan sekvensointia edeltävien protokollavaiheiden suorittamiseen.

Aloita NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 sykliä) (PN 20028871) -sekvensointitarvikkeiden valmistelu vähintään tuntia ennen käyttöä.

- Poista kirjaston laimennuspuskuri (HT1) -25 °C – -15 °C:n säilytyslämpötilasta. Sulata huoneenlämpöön. Pidä reagenssi viileänä sulattamisen jälkeen.
- Noudata *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)* -dokumentaation valmisteluohjeita muiden pakkauksen tarvikkeiden kohdalla.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykliä)
- Ota reagenssiputket rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
PhiX Internal Control (PX3 tai PhiX)	-25...-15 °C	Sulata huoneenlämpöön. Pidä reagenssi viileänä sulattamisen jälkeen.	Sekvensoinnin valmisteleminen

Taulukko 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

Reagenssi	Säilytys	Sulatusohjeet	Protokollavaihe
HP3	2–8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Sekvensoinnin valmisteleminen
RSB (vaaleanpunainen merkintä)	2 °C – 8 °C	Tuo huoneenlämpöön.	Sekvensoinnin valmisteleminen

Sekvensoinnin valmisteleminen

Jokaiseen DNA- ja RNA-sekvensointiajoon pitäisi sisältyä positiivinen kontrolli ja NTC. Kaikki DNA:n ja RNA:n NTC:t sekvensoidaan toistuvasti tarpeen mukaan, jotta jokaiseen ajoon sisältyy NTC. Jokaiseen DNA- ja RNA-ajoon sisältyy erillinen positiivinen kontrolli.

Valmisteleminen

- Tarkista [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 34](#).
- Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä dHP3 (laimennettu HP3).
- Merkitse mikrosentrifugiputkeen dPhiX (laimennettu PhiX).

4. Esilämmitä lämpöblokki 96 °C:n lämpötilaan mikrosentrifugiputkia varten.
5. Valmistele jääastia tai vastaava.

PhiX-kontrollin laimennus ja denaturointi

1. Sekoita HP3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
2. Yhdistä seuraavat määrät dHP3-mikrosentrifugiputkessa.
 - 10 µl HP3:a
 - 190 µl RNAasitonta/DNAasitonta- vettä
3. Sekoita dHP3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
4. Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
5. Sekoita PhiX-kontrolli vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Yhdistä seuraavat määrät dPhiX-mikrosentrifugiputkessa.
 - 8 µl RSB:tä
 - 2 µl PhiX -kontrollia
7. Lisää 10 µl dHP3:a dPhiX-putkeen.
8. Hävitä dHP3-putki.
9. Sekoita dPhiX-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
10. Denaturoi dPhiX inkuboimalla huoneenlämmössä 5 minuuttia.
11. Sekoita HT1 vorteksoimalla.
12. Lisää välittömästi 980 µl esijäähdytettyä HT1:tä dPhiX:ään.
13. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
14. Pidä PhiX kylmässä, kunnes sitä käytetään toisen laimennuksen valmistamisessa.
Lopullinen pitoisuus on 20 pM dPhiX.
15. Palauta PhiX, HP3 ja RSB säilytykseen.

Kirjastojen poolaus ja denaturointi TSO Comprehensive (EU) -määritystä varten

1. Mikäli NL PCR -levy oli säilytyksessä, sulata se huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sen jälkeen levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
2. Käytä monikanavapipettiä, jonka arvoksi on asetettu 30 µl, ja sekoita varovasti NL PCR -levyn kirjastot pipetoimalla viisi kertaa.
Käytä uusia kärkiä kutakin kirjastoa varten.



HUOMIO

Sekoita kirjastot hyvin optimaalisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

3. Valitse yksi seuraavista vaihtoehdoista kirjastojen poolausta, denaturointia ja laimennusta varten.

- **[Vaihtoehto 1]** Sekvensoi RNA-näytteistä ja DNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot samanaikaisesti. Katso [Vaihtoehto 1: DNA- ja RNA-kirjastot yhdessä sivulla 75](#).
- **[Vaihtoehto 2]** Sekvensoi vain DNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot. Katso [Vaihtoehto 2: Vain DNA-kirjastot sivulla 76](#).
- **[Vaihtoehto 3]** Sekvensoi vain RNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot. Katso [Vaihtoehto 3: Vain RNA-kirjastot sivulla 77](#).

Vaihtoehto 1: DNA- ja RNA-kirjastot yhdessä

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä PRL (poolatut RNA-kirjastot).
2. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä PDL (poolatut DNA-kirjastot).
3. Siirrä 10 µl kunkin normalisoidun RNA (cDNA) -kirjaston NL-levystä PRL-putkeen. Älä poolaa kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
4. Siirrä 10 µl kunkin normalisoidun DNA-kirjaston NL-levystä PDL-putkeen. Älä poolaa kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi NL PCR -levyyn. Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Sekoita PRL- ja PDL-putket vorteksoimalla.
7. Sentrifugoi PRL- ja PDL-putkia lyhyesti.
8. Inkuboi PRL- ja PDL-putkia lämpöblokkissa 96 °C:ssa 2 minuutin ajan.
9. Pidä PRL- ja PDL-putkia kylmässä 5 minuutin ajan.
10. Sekoita PRL- ja PDL-putket vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
11. Pidä PRL- ja PDL-putkia kylmässä.

Valmista ensimmäinen laimennus

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (Laimennus 1).
2. Siirrä 20 µl PDL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
3. Lisää 5 µl PRL:ää DIL1-putkeen.
4. Hävitä PDL- ja PRL-putket.
5. Lisää 475 µl ennalta jäähdytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennussuhde 1:20).
6. Sekoita DIL1-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Valmista toinen laimennus

1. Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (Laimennus 2).
2. Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
3. Hävitä DIL1-putki.

4. Lisää 1 660 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennussuhde 1:850).
5. Sekoita valmistettu 20 pM dPhiX vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Lisää 2,5 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
7. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
8. Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 -kasettiin (300 sykliä).
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.
9. Hävitä DIL2-putki.
10. Sentrifugoi NL PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä sitä sitten -25...-15 °C:n lämpötilassa enintään 32 vuorokautta.
11. Siirry sekvensointiin.
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.

Vaihtoehto 2: Vain DNA-kirjastot

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä PDL (poolatut DNA-kirjastot).
2. Siirrä kustakin normalisoidusta DNA-kirjastosta 10 µl NL-levystä PDL-putkeen.
Älä poolaa kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
3. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi NL PCR -levvyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
4. Sekoita PDL-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
5. Inkuboi PDL-putkea lämpöblokkissa 96 °C:ssa 2 minuutin ajan.
6. Pidä PDL-putkea kylmässä 5 minuutin ajan.
7. Sekoita PDL-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
8. Pidä PDL-putkea kylmässä.

Valmista ensimmäinen laimennus

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (Laimennus 1).
2. Siirrä 10 µl PDL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
3. Hävitä PDL-putki.
4. Lisää 190 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennussuhde 1:20).
5. Sekoita DIL1 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Valmista toinen laimennus

1. Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (Laimennus 2).
2. Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
3. Hävitä DIL1-putki.

4. Lisää 1 660 µl ennalta jäähdytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennussuhde 1:850).
5. Vorteksoi valmistettu 20 pM dPhiX ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Lisää 2,5 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
7. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
8. Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 -kasettiin (300 sykliä).
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.
9. Hävitä DIL2-putki.
10. Sentrifugoi NL PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä sitä sitten -25...-15 °C:n lämpötilassa enintään 32 vuorokautta.
11. Siirry sekvensointiin.
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.

Vaihtoehto 3: Vain RNA-kirjastot

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä PRL (poolatut RNA-kirjastot).
2. Siirrä kustakin normalisoidusta RNA (cDNA) -kirjastosta 10 µl NL-levystä PRL-putkeen.
Älä poolaa kahta kirjastoa, joissa on sama indeksialuke.
3. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi NL PCR -levvyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
4. Sekoita PRL-putki vorteksoimalla.
5. Sentrifugoi PRL-putkea lyhyesti.
6. Inkuboi PRL-putkea lämpöblokkissa 96 °C:ssa 2 minuutin ajan.
7. Pidä PRL-putkea kylmässä 5 minuutin ajan.
8. Sekoita PRL-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
9. Pidä PRL-putkea kylmässä.

Valmista ensimmäinen laimennus

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (Laimennus 1).
2. Siirrä 10 µl PRL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
3. Hävitä PRL-putki.
4. Lisää 190 µl ennalta jäähdytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennussuhde 1:20).
5. Sekoita DIL1 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Valmista toinen laimennus

1. Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (Laimennus 2).
2. Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.

3. Hävitä DIL1-putki.
4. Lisää 1 646 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennussuhde 1:843).
5. Vorteksoi valmistettu 20 pM dPhiX ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Lisää 16,7 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
7. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
8. Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 -kasettiin (300 sykliä).
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.
9. Hävitä DIL2-putki.
10. Sentrifugoi NL PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä sitä -25...-15 °C:n lämpötilassa enintään 32 vuorokautta.
11. Siirry sekvensointiin.
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.

Tulosten tulkinta

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen sekvensointitulokset raportoidaan kullekin näytteelle yksittäin PDF-raportissa ja JSON-raportissa. Lisäksi näytetasolla luodaan Low Depth Report -raportti (`LowDepthReport.tsv`).

Ajotasolla luodaan seuraavat tuotostiedostot:

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

Vain laadunvalvonnan läpäisseet variantit näkyvät PDF- ja JSON-raporteissa.

Tarkat analyysitiedot ovat kohdassa *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)*.

Kytkösdiaagnostiikan tulokset

Kunkin kytkösdiaagnostiikan (CDx) käyttötarkoitusta varten on kolme mahdollista tulosta:

- **Positiivinen** — Variantti tai biomarkkeri havaitaan ja luokitellaan tasoksi 1 (CDx).
- **Ei havaittu** — Näytteessä ei havaittu CDx:n käyttöaiheeseen liittyviä varianteja tai biomarkkereita. Näytteelle valittu kasvaintyyppi soveltuu CDx:lle.
- **Ei tulosta** — Variantin tilan määrittäminen ei ole mahdollista yhdestä tai useammasta seuraavasta syystä:
 - CDx:n käyttöaihe ei ole sovellettavissa testattuun näytteeseen, koska näytteelle valittu kasvaintyyppi ei sovellu CDx:n kasvaintyyppiin.
 - Sekvensointiajo ei läpäissyt laadunvarmistuksen spesifikaatioita.
 - Kirjasto ei läpäissyt vaadittuja laadunvarmistuksen spesifikaatioita.
 - Soveltuvaa nukleiinihappoa ei ajettu.

Kaikki CDx:n käyttöaiheen tulokset on raportoitu kytkö diagnostiikan tulosten osiossa JSON-raportissa. Vain ne käyttöaiheet, joiden tulos on positiivinen, on lueteltu kytkö diagnostiikan tulosten osiossa PDF-raportissa.

Kasvaimen profilointivariantit

TSO Comprehensive (EU) on suunniteltu raportoimaan somaattisista varianteista, kun raportoidaan varianteista, joilla on kliinisesti merkittävää näyttöä, tai varianteista, joilla on mahdollisesti kliinistä merkitystä. TSO Comprehensive (EU) -määritysohjelmisto käyttää KB:tä, joka määrittää, onko kukin havaittu ja kelpoinen variantti ([Taulukko 2](#)) kliinisesti merkittävä tai mahdollisesti kliinisesti merkittävä. Määrittely perustuu terapeutiseen tai diagnostiseen näyttöön tai prognostisista assosiaatioista saatuun näyttöön. KB:ssä huomioidaan, ovatko assosiaatiot vakiintuneita (vai ei) testatussa kasvaintyyppissä. Alttiutta tai syöpäriskiini liittymistä ei ole sisällytetty tietokantaan. Yleiset polymorfismit poistetaan.

Kasvaimen profilointivarianttien positiiviset tulokset luokitellaan genomilöydöksiksi, joissa on näyttöä kliinisestä merkittävydestä (Taso 2), tai genomilöydöksiksi, jotka ovat mahdollisesti kliinisesti merkittäviä (Taso 3), asennetun tietokannan ja määritetyn kasvaintyyppin perusteella.

Laadunvalvontaviat johtavat nollatuloksiin sellaisten varianttityyppien osalta, jotka ovat merkityksellisiä kyseiselle laadunvalvontamittarin hylkäykselle. Katso lisätietoja [Taulukko 40](#) ja [Taulukko 41](#). Ne kasvaimen profilointisijainnit, joilla on riittämätön syvyys, luetellaan Low Depth Report -raportissa eikä TSO Comprehensive (EU) -raportissa.

Laadunvalvonta

- Katso nukleiinihapon kvantifiointia koskevat tiedot ja materiaalin vähimmäissyöttöä koskevat vaatimukset kohdasta [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26](#).
- TSO Comprehensive (EU) -analyysimoduuli määrittää sekvensointiajon ja näytteen validiteetin automaattisesti ja raportoi sen. Tarkat analyysitiedot ovat kohdassa *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)*.
- TSO Comprehensive (EU) -raportissa, joka on saatavana PDF- ja JSON-muodoissa, on yhteenveto laadunvalvonnan tuloksista. Raporttiedostot ovat analyysikansiossa. Katso analyysikansion (sisältää PDF- ja JSON-raportit) ja ajokansion sijainnit *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)* -oppaasta.

Taulukko 40 TSO Comprehensive (EU) -raportin tuloksen laadunvalvontamittarit

Tuotostyyppi	Mittari	Tekniset tiedot	Kuvaus	Ohjearvon hylkäyksen vaikutus*
Sekvensointi-ajo	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Suodattimen (PF) läpäisevien readien prosenttiosuus.	Sekvensointiajo mitätöity. Ajon näytteiden kohdalla ei raportoitu tuloksia.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Emäksen tunnistusten keskimääräinen prosenttiosuus laatupisteytyksen ollessa vähintään Q30 sekvenssifragmentin 1 kohdalla.	Sekvensointiajo mitätöity. Ajon näytteiden kohdalla ei raportoitu tuloksia.
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Emäksen tunnistusten keskimääräinen prosenttiosuus laatupisteytyksen ollessa vähintään Q30 sekvenssifragmentin 2 kohdalla.	
DNA-kirjastot	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3 106 TAI > 3 106 ja P_VALUE ≤ 0,049	Mittautustieto, jolla arvioidaan kontaminaation todennäköisyyttä yleisten varianttien VAF:n avulla. Kontaminaatiopisteytys perustuu SNP-kohteiden VAF-jakaumaan. Kontaminaation P-arvoa käytetään pitkälle uudelleenjärjestyneiden genomien arvioinnissa. Arvoa käytetään vain, kun kontaminaatiopisteet ylittävät ohjearvon ylärajan.	DNA-tuloksia ei raportoida.

Tuotostyyppi	Mittari	Tekniset tiedot	Kuvaus	Ohjearvon hylkäyksen vaikutus*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Näytteen mediaanifragmenttipituus.	TMB- tai pienten DNA-varianttien tuloksia ei raportoida.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (määrä)	≥ 150	Eksonifragmentin mediaanikattavuus kaikissa eksonin emäksissä.	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90,0	Sellaisten eksoniemästen prosenttiosuus, joiden fragmenttikattavuus on 50-kertainen.	
	USABLE_MSI_SITES (määrä)	≥ 40	Sellaisten MSI-paikkojen määrä, joita voidaan käyttää MSI-tunnistukseen (sellaisten mikrosatelliittipaikkojen määrä, joiden kohdealueiden kattavien readien määrä riittää mikrosatelliitin epästabiiliuden tunnistamiseen).	MSI-tuloksia ei raportoida.
	COVERAGE_MAD (määrä)	≤ 0,210	Absoluuttisten poikkeamien mediaani kunkin CNV-kohdealueen normalisoidun lukumäärän mediaanista.	Geenin monistumisen tuloksia ei raportoida.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNVTARGET (määrä)	≥ 1,0	Säilöjen raakamäärän mediaani CNV-kohdetta kohti.	
RNA-kirjastot	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80	Näytteen mediaanifragmenttipituus.	Fuusioiden tai silmukointivariantin tuloksia ei raportoida.

Tuotostyyppi	Mittari	Tekniset tiedot	Kuvaus	Ohjearvon hylkäyksen vaikutus*
	MEDIAN_CV_GENE_500X (kerroin)	≤ 0,93	MEDIAN_CV_GENE_500X on kattavuuden yhdenmukaisuuden mittari. Jokaiselle geenille, jonka kattavuus on vähintään 500x, lasketaan geenirungon kattavuuden variaatiokerroin. Tämä mittaustieto on näiden arvojen mediaani. Jos arvo on suuri, se tarkoittaa suurta variaatiota ja ongelmaa kirjaston valmistelussa, kuten vähäistä näytesyötettä ja/tai koettimen affiniteettipuhdistuksen ongelmia. Tämä mittaustieto lasketaan käyttämällä kaikkia readeja (mukaan lukien duplikaateiksi merkityt readit).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (määrä)	≥ 9 000 000	Sellaisten sekvenssifragmenttien kokonaismäärä, jotka kartoitetaan kohdealueille. Tämä mittaustieto lasketaan käyttämällä kaikkia readeja (mukaan lukien duplikaateiksi merkityt readit).	

* Onnistuneiden tulosten kohdalla on merkintä PASS (HYVÄKSYTTY).

Taulukko 41 TSO Comprehensive (EU) -raportin tuloksen kontrollimittarit

Tuotostyyppi	Mittari	Tekniset tiedot	Ohjearvon hylkäyksen vaikutus*
Positiivinen kontrolli	DNA External Control	23/24 määritettyä varianttia tunnistettu	Mitätöi potilasnäytteet manuaalisesti kontrollinäytteen tulosten perusteella. Analyysimoduuliohjelmisto ei automaattisesti mitätöi potilasnäytteitä kontrollinäytteen tulosten perusteella.
	RNA External Control	12/13 määritettyä varianttia tunnistettu	
Kontrolli ilman templaattia	DNA Median Exon Coverage for TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Mitätöi potilasnäytteet manuaalisesti kontrollinäytteen tulosten perusteella. Analyysimoduuliohjelmisto ei automaattisesti mitätöi potilasnäytteitä kontrollinäytteen tulosten perusteella.
	RNA Gene Above Median Cutoff	≤ 1	

* Onnistuneiden tulosten kohdalla on merkintä PASS (HYVÄKSYTTY).

- Toista virheelliset sekvensointiajot.
- Toista kirjastojen testit, joilla on seuraavat tulokset:
 - Kontaminoituneet DNA-kirjastot.
 - Virheelliset RNA-kirjastot.
 - Testejä voidaan toistaa, jotta saadaan useampia variantti- tai biomarkerituloksia DNA-kirjastoille, jotka on mitätöity yhdelle, mutta ei kuitenkaan kaikille varianttityypeille.
- Variantin määrittämistä varten arvioidaan positiiviset kontrollit. Jos positiiviset kontrollit eivät täytä variantin määrittämisen ohjearvoja, mitätöi sekvensointiajo manuaalisesti. Analyysimoduuliohjelmisto ei automaattisesti mitätöi potilasnäytteitä kontrollinäytteen tulosten perusteella.
- NTC:t arvioidaan DNA:n osalta mediaanin eksonikattavuuden suhteen sekä RNA:n osalta mediaanikatkaisurajan yläpuolella olevien geenien suhteen. Jos negatiiviset kontrollit eivät täytä ohjearvoja, mitätöi manuaalisesti kirjaston valmistelutapahtuma ja kaikki siihen liittyvät sekvensointiajot. Analyysimoduuliohjelmisto ei automaattisesti mitätöi potilasnäytteitä kontrollinäytteen tulosten perusteella.
- Toteuta laadunvalvonnan lisätoimenpiteitä voimassa olevien paikallisten määräysten tai akkreditointivaatimusten mukaisesti.

Lisätietoja kirjastojen sekvensointiajojen tai testien toistamisesta on kohdassa [Vianmääritys sivulla 84](#).

Vianmääritys

Seuraavan taulukon avulla voit tehdä työnkulun ongelmien vianmäärityksen. Vianmääritykseen liittyviä lisätoimia tarvitaan, jos näytteen sekvensointiajo tai kirjaston valmistelu epäonnistuu kaksi kertaa. Ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Sekvensointiajo ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita.	<ul style="list-style-type: none"> Poolausvirhe Laimennusvirhe PRL/PDL:n epätäydellinen lämpödenaturaatio Tarvikkeiden valmisteluun liittyvät ongelmat (esim. ei sulanut riittävästi, kondensaatio/jäämät virtauskyvetissä) 	<ul style="list-style-type: none"> Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 73.
	<ul style="list-style-type: none"> Rikastuskoettimien virheellinen käyttö (esimerkiksi DNA-näytteiden kanssa käytettävät OPR1-koettimet, RNA-näytteiden kanssa käytettävät OPD2-koettimet) Virhe kirjaston valmistelun työnkulussa ensimmäisen hybridisaatiovaiheen aikana tai sen jälkeen 	<ul style="list-style-type: none"> Rikasta kirjastot uudelleen monistettujen kirjastojen näytteiden (ALS) PCR-levyltä. Katso kohta Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen sivulla 57.
	Näytesyötettä koskevia vaatimuksia ei noudatettu	Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso kohta RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely sivulla 43 tai gDNA:n fragmentointi sivulla 48 .

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
	Virhe kirjaston valmistelun työkulussa indeksi-PCR-vaiheen aikana tai sitä ennen	Rikasta kirjastot uudelleen monistettujen kirjastojen näytteiden (ALS) PCR-levyltä. Katso kohta Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen sivulla 57 .
	Laitteeseen liittyvä ongelma	Ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.
Virhe raportin luomisessa tai yleinen laitevirhe (esim. verkkovirhe, virheet reagenssien lataamisessa/purkamisessa jne.)	Ohjelmisto- tai laiteongelma.	Katso ohjeet raportin luomiseen Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661) -oppaasta. Saat apua ottamalla yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.
DNA-kirjasto ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita.	Näytesyötettä koskevia vaatimuksia ei noudatettu.	Varmista asianmukainen näytteen syöttö ja toista kirjaston valmistelu gDNA:n fragmentointi -vaiheesta. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25) ja Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26).
	Käyttö- tai laitevirhe määrittämissä työkulussa.	Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäilty käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmäärittäminen. <ul style="list-style-type: none"> Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 73. Rikasta kirjastot uudelleen monistettujen kirjastojen näytteiden (ALS) PCR-levyltä. Katso kohta Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen sivulla 57. Aloita kirjaston valmistelu työkulun alusta. Katso kohta gDNA:n fragmentointi sivulla 48.

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
	CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE -kriteerit eivät täyty.	<p>Katso kohdasta Varoitukset ja varotoimet tietoja ristikontaminaation välttämiseksi. Tarkista levyn asettelu ja kirjaston indeksointi varmistaaksesi, että saman indeksin kirjastoja ei ole sekvensoitu yhdessä.</p> <p>Aloita kirjastojen valmistelu työnkulun alusta asiaan liittyvien kirjastojen osalta. Katso kohta gDNA:n fragmentointi sivulla 48.</p> <p>Kontaminaatio on voinut tapahtua näytteen uuttamisen aikana. Uuttaminen on ehkä toistettava sen varmistamiseksi, että näytteessä ei ole kontaminaatiota.</p>
	Käytettävä MSI epäonnistui.	<p>Tarkista ultrasonikaattorin valmistajalta asetukset käyttöä varten (mukaan lukien vedenkorkeus ja putkityyppi). Varmista, että näytteet lisätään määritykseen asianmukaisesti. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25) ja Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26).</p> <p>Näytteen uusi uuttaminen ja/tai vaiheen gDNA:n fragmentointi toistaminen voi olla tarpeen, jos näyte on liian fragmentoitunut tai vaurioitunut.</p>

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
	Näyte on liian fragmentoitunut tai siinä on nukleinihappovaurioita, jotka vaikuttavat kykyyn luoda riittävän yksilöityjä kirjastoja.	Tarkista kohta Ultrasonikaattorin määritykset DNA-fragmentointia varten sivulla 21) ja ultrasonikaattorin valmistajan käyttöasetukset (mukaan lukien vedenkorkeus ja putkityyppi). Varmista, että näytteet lisätään määritykseen asianmukaisesti. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25) ja Nukleinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26). Näytteen uusi uuttaminen ja/tai vaiheen gDNA:n fragmentointi toistaminen voi olla tarpeen, jos näyte on liian fragmentoitunut tai vaurioitunut.
RNA-kirjasto ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita.	Näytesyötettä koskevia vaatimuksia ei noudatettu.	Varmista asianmukainen näytteen syöttö ja toista kirjaston valmistelu RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely -vaiheesta alkaen. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25) ja Nukleinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26).
	Käyttö- tai laitevirhe määrityksen työnkulussa.	Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäilty käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys. <ul style="list-style-type: none"> • Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmistelemisen sivulla 73. • Rikasta kirjastot uudelleen monistettujen kirjastojen näytteiden (ALS) PCR-levyltä. Katso kohta Ensimmäisen hybridisaation määritys sivulla 57. • Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso kohta RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely sivulla 43.

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
	Näyte on liian fragmentoitunut tai siinä on nukleinihappovaurioita, jotka vaikuttavat kykyyn luoda riittävän yksilöityjä kirjastoja.	Varmista, että näytteet lisätään asianmukaisesti. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25) ja Nukleinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26). Näytteen uusi uuttaminen voi olla tarpeen, jos näyte on liian fragmentoitunut tai vaurioitunut.
Positiivisen kontrollin epäonnistuminen (DNA/RNA).	Näytteen syöttöä koskevat vaatimukset eivät täytyneet positiivisen kontrollin osalta.	Varmista, että lisäys määrittämiseen tapahtuu asianmukaisesti. Tarkista levyn asettelu ja varmista, että asianmukaiset reagenssit (koettimet, indeksit) ovat asianmukaisissa kuopissa. Varmista, että positiivinen kontrollinäyte säilytetään etiketin ohjeiden mukaisesti. Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavasta vaiheesta alkaen riippuen siitä, missä epäilty käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui, kaikkien samaa positiivista kontrollia käyttävien näytteiden kohdalla. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys.
	Käyttö- tai laitevirhe määrittämisen työnkulussa.	<ul style="list-style-type: none"> • Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 73. • Rikasta kirjastot uudelleen monistettujen kirjastojen näytteiden (ALS) PCR-levyltä. Katso kohta Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen sivulla 57. • Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso kohta RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely sivulla 43 tai gDNA:n fragmentointi sivulla 48.

Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
NTC-virhe (DNA/RNA).	Ristikontaminaatio tai työalueen saastuminen tapahtui.	Katso kohdasta Varoitukset ja varotoimet tietoja työalueiden dekontaminoinnista ja ristikontaminaation välttämisestä. Tarkista levyn asettelu ja kirjaston indeksointi varmistaaksesi, että saman indeksin kirjastoja ei ole sekvensoitu yhdessä. Toista kirjaston valmistelu työnkulun alusta alkaen kaikille kirjastoille, joilla on yhteinen templaattia sisältämätön kontrolli.
	Kirjaston virheellinen indeksointi.	
Ohjelmisto osoittaa, että positiiviset ja/tai negatiiviset kontrollit eivät sisällyneet sekvensointiajona.	Syöpätyypin virheellinen määrittäminen Local Run Manager -sovelluksen ajosuunnittelussa.	Suorita analyysi siten, että kontrollit on tunnistettu oikein, kuten Analysis Module -työnkuluoppaassa on neuvottu (kts. kohta <i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)</i>).

Suorituskykyominaisuudet

TSO Comprehensive (EU) on kohdennettu NGS-paneeli, jolla voidaan tunnistaa 517 geenin muutoksia. Pienet DNA-variantit (yksittäiset nukleotidivariantit [SNV:t], monen nukleotidin variantit [MNV:t], insertiot ja deleetiot) kelpaavat raportointiin kaikkien 517 geenin suhteen. Kasvaimen mutaatiokuorma raportoidaan pistemääränä, joka johdetaan somaattisten ei-ajajavarianttien lukumäärästä megaemästä kohden (katso lisätietoja kohdasta *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)*). MSI raportoidaan tilana. Geenien monistumiset ovat kelpoisia raportointiin MET- ja ERBB2-geeneistä. Kohdassa [Määrittämisen yhteenveto ja selitys sivulla 1](#)) eritellään 23 geeniä, joihin liittyvät fuusiot ovat raportoitavissa. Liitosvariantit ovat kelpoisia raportointiin MET- ja EGFR-geeneistä. Jotta variantit voidaan raportoida, ne on havaittava ja niistä on oltava näyttöä TSO Comprehensive (EU) -määrittämisen KB:ssä, ja niiden on oltava kelpoisia testatun kudostyyppin perusteella. Jotta NTRK-fuusiot voidaan raportoida, fuusioparin on oltava 5', ja NTRK-kinaasialueen on oltava eheä.

Pienten DNA-varianttien kohdalla edustava lähestymistapa paneelin kohdennettujen geenien validointiin suoritettiin SNV-, MNV-, insertio- ja deleetiokohteita edustavilla tiedoilla. Geenien monistumisten, fuusioiden ja silmukointivarianttien kohdalla testaus suoritettiin geenien tasolla. TMB ja MSI arvioitiin, mikäli niin ilmoitettiin. NTRK-fuusioiden CDx-ilmoituksen osalta FFPE-näytteiden fuusiot testattiin tutkimuksilla, joissa keskityttiin ilmoitusta koskevaan suorituskykyyn (kuten määrittämisen havaitsemisraja, laboratorion sisäinen tarkkuus, toistettavuus, tarkkuus ja kliininen suorituskyky).

[Taulukko 42](#) sisältää eri tutkimuksissa laskettujen mittaustietojen määritelmiä.

Taulukko 42 Mittaustietojen määritelmät

Termi	Määritelmä
Positiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (PPA)	Positiivisista kokonaistunnistuksista oikein tunnistettujen positiivisten prosenttiosuus suhteessa ortogonaaliseen menetelmään.
Negatiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (NPA)	Negatiivisista kokonaistunnistuksista oikein tunnistettujen negatiivisten prosenttiosuus suhteessa ortogonaaliseen menetelmään.
Yhtäpitävyyden kokonaisprosenttimäärä (OPA)	Kokonaishavainnoista oikein tunnistettujen positiivisten ja negatiivisten prosenttiosuus suhteessa ortogonaaliseen menetelmään.
Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (PPC)	Sellaisten havaintojen prosenttimäärä, jotka ovat positiivisia kohteen suhteen sellaisten havaintojen joukossa, joiden odotetaan olevan positiivisia kohteen suhteen.
Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (PNC)	Sellaisten havaintojen prosenttimäärä, jotka ovat negatiivisia kohteen suhteen sellaisten havaintojen joukossa, joiden odotetaan olevan negatiivisia kohteen suhteen.
n/N	Positiivisten tai negatiivisten havaintojen määrän (n) ja havaintojen kokonaismäärän (N) osamäärä, josta saadaan PPC tai PNC. n:n ja N:n arvot voivat olla eri tasoisia (esim. variantti tai geeni) tai ryhmäkohtaisesti yhdistettyjä (esim. SNV:t).
Keskihajonta (SD)	Tunnusluku, joka kuvaa muuttujan arvojen poikkeamaa sen keskiarvosta.
Variaatiokerroin prosentteina (%CV)	Keskiarvolla jaettu keskihajonta prosentteina.

Ristikontaminaatio

Ristikontaminaatiotutkimuksella arvioitiin, ilmeneekö -määrityksessä vääriä positiivisia tuloksia, jotka johtuivat kuoppien välisestä kontaminaatiosta näytekirjaston valmistelun aikana sekä peräkkäisten sekvensointiajojen välisestä kontaminaatiosta. Tämä analyysi tehtiin pienille DNA-variantteille (jotka vaikuttavat myös TMB:hen), fuusioille, geenimonistuksille ja MSI:lle. Kirjastot valmisteltiin luonnehdituista näytteistä ruutuasetteluna vaihtoehtoisin näyttein arvioidakseen kuoppien välistä kontaminaatiota ja vaihtoehtoisin indekseihin ajojen välisen kontaminaation arvioimiseksi, kun sekvensointi tehdään peräkkäin samalla NextSeq 550Dx -laitteella. Ristikontaminaatiotutkimus osoitti nolla kontaminaatiotapahtumaa, joita tunnistettiin tutkimalla kussakin näytteessä havaittuja variantteja, eikä vääriä positiivisia tuloksia havaittu.

TSO Comprehensive (EU) -määritykselle suunniteltiin kaksi QC-mittaria (CONTAMINATION_SCORE ja P_VALUE) havaitsemaan näytteiden kontaminaatio DNA-näytteistä. Kontaminaation havaitsemisen herkkyys arvioitiin. FFPE-kasvain-DNA-näytteitä sekoitettiin vaihteleviin määriin FFPE-normaali-DNA-näytteitä tarkoituksellisesti kontaminoituneiden näytteiden luomiseksi.

Yhteensä 1 112 kontaminaatiohavaintoa tehtiin, ja kontaminaatiota havaittiin 95 %:ssa (1 054) havainnoista. Havaitsemisprosentti nousi 96 %:iin (939/976), kun kontaminaatioprosentti oli 10–90 % (massa/massa). Näistä 37 havainnosta, jotka koskivat 10–90 %:n kontaminaatiota, kun kontaminaatiota ei havaittu, 12 ei täyttänyt kattavuusmäärittystä pienten DNA-varianttien tunnistamiseen. Matala kattavuus vaikeuttaa kontaminaation havaitsemista, mutta pieniä DNA-variantteja ei raportoida kontaminaation vaikutuksen lieventämiseksi. 15 havaintoa ei täyttänyt geenimonistuksen ohjearvoa (säilöjen mediaanimäärän QC-mittari) geenimonistusten tunnistamiseen. Näytteille ei raportoida tässä tapauksessa geenimonistuksen tuloksia.

Tutkimuksessa osoitettiin, että TSO Comprehensive (EU) -määrityksen ristikontaminaation odotetaan olevan vähäistä näytekuppien ja ajojen välillä. Nämä tulokset yhdessä ohjelmiston kontaminaatiometriikan kanssa vähentävät näytteiden kontaminaatiosta johtuvien väärin varianttitulosten riskiä.

Nukleiinihapon uuttamispakkauksen arviointi

TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä arvioitiin kolme kaupallisesti saatavilla olevaa DNA- ja RNA-uuttamispakkausta. Näillä kolmella uuttamispakkauksella eristettiin sekä DNA:ta että RNA:ta samoista FFPE-kudosleikkeistä. Pakkaukset erosivat toisistaan parafiinin poistoaineen ja nukleiinihapon sitomisvaiheiden osalta (Taulukko 43). Pakkaus 1 oli ensisijainen uuttamispakkaus, jota käytettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen suorituskyvyn määrittämisessä.

Taulukko 43 Pakkauksen ominaisuudet

Pakkaus	Parafiinin poistoaine	Nukleiinihapon sidonta
1	Oma	Pylväs
2	Ksyleeni	Pylväs
3	Mineraaliöljy	Magneettihelmet

Taulukko 44 ja Taulukko 45 sisältävät yhteenvedon uuttamispakkausten vaikutuksesta kirjaston kelvollisuuteen ja variantin tunnistamiseen. Erosta raportoitiin, jos uuttamispakkausten keskiarvot poikkesivat toisistaan huomattavasti. Keskimääräinen ero uuttamispakkausten välillä laskettiin käyttäen pakkausta 1 kontrollina, koska pakkausta 1 käytettiin useimpien TSO Comprehensive (EU) -määrityksen analyysitutkimuksissa käytettyjen nukleiinihappojen eristämiseen. Keskimääräinen ero suhteessa pakkaukseen 1 raportoitiin sen havainnollistamiseksi, miten eri uuttamispakkaukset vaikuttaisivat muihin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen analyysitutkimuksiin.

Taulukko 44 Uttamispakkaus vaikuttaa kirjaston validiteettiin

Varianttityyppi	Kirjaston QC-mittari	Keskimääräinen ero suhteessa pakkaukseen 1
DNA:n pienet variantit/TMB	Eksonikattavuuden mediaani (määrä) PCT Exon 50X (%) Inserttikoon mediaani (bp)	Pakkauksessa 2 56 readia vähemmän Pakkauksessa 3 0,298 % enemmän Pakkaus 2 ja pakkaus 3 3 bp:ta alempi
DNA MSI	Käytettävissä olevat MSI-paikat	Pakkauksessa 3 8 paikkaa enemmän
DNA:n geenien monistuminen	Coverage MAD (määrä) Säilöjen mediaanimäärä	Pakkauksessa 2 0,0043 vähemmän Pakkauksessa 3 0,5825 vähemmän, pakkauksessa 3 0,3086 vähemmän
RNA (Fuusiot/liitosvariantit)	Inserttikoon mediaani (bp) Loki (CV Gene500X:n mediaani) Kokonaismäärä kohdereadeissa	Pakkauksessa 3 2 bp:ta enemmän Pakkauksessa 2 0,029 enemmän Ei merkittävää eroa

Uttamispakkauksilla 2 ja 3 havaittiin olevan enemmän tukevia readeja, joten havaitsemisrajan lähellä olevilla fuusio- ja liitosvarianteilla LoD:n olisi suurempi havaitsemistodennäköisyys uttamispakkauksen valinnan vuoksi.

Taulukko 45 Uttamispakkaus vaikuttaa varianttitunnistukseen

Varianttityyppi (yksiköt)	Varianttitunnistus (keskimääräinen ero suhteessa pakkaukseen 1)
Pienet DNA-variantit (VAF)	Ei teknisesti merkittävä Kohdevariantit: pakkausten välinen varianssi oli pieni suhteessa jäämään Ei-kohdennetut variantit: Ei merkittäviä eroja kahdessa ensimmäisessä VAF-säilössä. Ei merkittäviä eroja, kun tilastollinen merkitsevyys havaitaan.
TMB megaemäskohtainen mutaatio	Ei teknisesti merkittävä, pakkausten välinen varianssi oli pieni suhteessa jäämään
MSI (instabiilien kohtien prosenttiosuus)	Pakkauksessa 3 1,9 % vähemmän epästabiileissa kohdissa
Geenimonistus (kertamuutos)	Pakkauksessa 2 (0,06) ja pakkauksessa 3 (0,08) suurempi kertamuutos
Fuusiot (tukevat readit)	Pakkauksessa 2 tukevien readien määrä lisääntyi 51 % ja pakkauksessa 3 23 %
Liitosvariantit (tukevat readit)	Pakkauksessa 2 ja pakkauksessa 3 tukevien readien määrä lisääntyi 48 %

Häiritsevät aineet

Mahdollisten endogeenisten ja eksogeenisten aineiden vaikutus TSO Comprehensive (EU) -määrityksen suorituskykyyn arvioitiin. Endogeeniset aineet (melaniini ja hemoglobiini) liitettiin näytteisiin nukleiinihapon eristämisen prosessin aikana. Eksogeeniset aineet (etanoli, ksyleeni ja proteinaasi K) olivat läsnä nukleiinihapon eristämisen prosessin aikana, ja niitä oli lisäksi lisätty puhdistettuun nukleiinihappoon ennen kirjaston valmistelua. Jos liitetyn proteinaasi K:n häiriötä havaittiin, myös proteinaasi K:n pitoisuuksien nousu eristämisen prosessin aikana arvioitiin. Ylimääräisiä indeksialukkeita (15 % ja 30 %) lisättiin kirjaston valmistelun aikana. Indeksialukkeita lukuun ottamatta aineet lisättiin aivo-, rinta-, koolon-, keuhko-, NSCLC-, munasarja-, eturauhas-, sylkirauhas-, iho-, pehmytkudos- ja kilpirauhaskudoksesta sekä medullaarisesta kilpirauhaskudoksesta otettuihin FFPE-näytteisiin. Kahdeksan näytettä eristettiin DNA-analyysiä varten ja 13 eristettiin RNA-analyysiä varten. Indeksialukkeiden osalta DNA-analyysiin käytettiin kuusi FFPE-näytettä kolmesta eri kudostyyppistä (kilpirauhanen, virtsarakko, koolon) ja RNA-analyysiin viisi FFPE-näytettä neljästä eri kudostyyppistä (keuhko, kilpirauhanen, koolon, rinta). Minkään 16 ainutkertaisen näytteen kohdalla ei ollut ei-liitettyä endogeenista kontrollia eikä puskuria tai vesiliitettyä eksogeenista kontrollia. Nekroosin vaikutus arvioitiin eri sarjassa, johon kuului kahdeksan FFPE-näytettä keuhkojen, aivojen, koolonin ja keuhkojen kudoksista. Kullekin nekroosinäytteelle oli makrodissektoitu kontrolli, jossa ei ollut nekroosia. Kaikkien häiritsevien aineiden kohdalla testattiin neljä näyte- ja ainekohtaista rinnakkaisnäytettä TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä, ja niitä verrattiin niiden vastaavaan kontrolliolosuhteeseen pienten DNA-varianttien, geenin monistumisten, RNA-fuusioiden ja RNA-liitosvarianttien tunnistamiseksi sekä MSI-tilan ja TMB-pisteiden osalta. Sekä CDx- että kasvaimen profiloitavariantit sisällytettiin mukaan.

DNA-variantin tunnistus

Melaniini (0,2 µg/ml), hemoglobiini (2 mg/ml), etanoli (5 %), proteinaasi K (nukleiinihappo 0,04 mg/ml) ja ksyleeni (0,0001 %) eivät vaikuta TMB-pisteisiin, MSI-tilaan, pieniin DNA-variantteihin ja geenien monistumisiin.

RNA-variantin tunnistus

Tiedot eivät tue melaniinin (0,2 µg/ml), etanolin (5 %) ja ksyleenin (0,0001 %) aiheuttamaa häiriötä RNA-fuusioissa tai liitosvarianteissa. Hemoglobiini (2 mg/ml) häiritsi (vähensi tukevia readeja) kolmea eri liitosvarianttia MET-geenissä. Se ei vaikuttanut AR-geenin liitosvarianttiin (kolme eri näytettä) eikä yhteen EGFR-geenin liitosvarianttiin (yksi näyte). Jos laboratorio käyttää RNA:ta määrityksen kanssa, hemoglobiinia sisältävää kudosta on vältettävä tai se on minimoitava, kun leikkeitä otetaan kudosplokista.

Proteinaasi K (0,04 mg/ml nukleiinihappossa) häiritsi RNA-fuusioita ja liitosvariantteja. Proteinaasi K testattiin pitoisuuksilla 2,6 mg/ml ja 5,2 mg/ml uuttamisen prosessin aikana, jotka ovat 2 x ja 4 x vakiopitoisuus kaupallisesti saatavilla olevassa pakkauksessa. Fuusiot estyivät 4-kertaisella, mutta ei 2-kertaisella proteinaasi K:n määrällä. Liitosvariantit estyivät 2-kertaisella proteinaasi K:n määrällä. Proteinaasi K:ta tai vastaavaa entsyymiä ei pidä lisätä uuttamisen aikana uuttamispakkauksen vakiopitoisuudesta.

Liitosvariantteja tukevien readien määrä vähenee, kun indeksialukkeita on 30 % normaalia enemmän, mutta ei silloin, jos ylimääräisiä alukkeita on 15 % normaalia enemmän.

Nekroosi

Nekroottisen kudoksen esiintyminen 70 %:iin asti ei vaikuttanut TMB-pisteisiin, MSI-tilaan tai pieniin DNA-variantteihin. RNA-varianttien (tukevat readit) ja geenien monistumisen (kertamuutos) tunnistus väheni näytteissä, joiden kudosalueella oli $\geq 25\%$ ja $\geq 23\%$ (pinta-alan mukaan mitattuna) nekroottista sisältöä. Jos näyteosiot sisältävät yli $\geq 23\%$ nekroottista kudosta kudoksen kokonaisalueella, nekroottinen kudos tulee dissektoida makrotasolla.

Stabiilius

Reaaliaikainen stabiilius

Reaaliaikaista stabiiliutta käytettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityspakkauksen käyttöään määrittämiseksi, kun pakkausta säilytetään merkinnöissä esitettyjen olosuhteiden mukaisesti. Tutkimusasetelma perustui kolmen reagenssierän testaukseen ja siinä käytettiin CLSI EP25-A:ssa kuvattua klassisen stabiiliuden tutkimusasetelmaa. Pakkaukset säilytettiin lopullisessa pakkausmuodossa koko tutkimuksen ajan tuotemerkinnöissä määritetyissä säilytysolosuhteissa. Pakastettuja pakkauksen osia säilytettiin -15 °C – -25 °C :ssa. Jääkaapissa säilytettäviä pakkauksen osia säilytettiin 2 °C – 8 °C :ssa.

Pakkaukset testattiin ulkoasun ja pakkauksen toiminnallisten vapautuskriteerien suhteen tietyissä aikapisteissä. Myös varianttien tunnistaminen ja näytteen QC-mittarien trendit analysoitiin QC-kontrollimateriaalille. Kullekin reagenssille määritettiin säilyvyysaika. Vanhenemispäivämäärät määritetään valmistuspäivämäärän ja säilyvyysajan perusteella. Pakkauksen vanheneminen määritetään ensimmäiseksi vanhenevan reagenssin perusteella.

Käytönaikainen vakaussarja

TSO Comprehensive (EU) -määrityspakkauksen käytönaikainen stabiilius arvioitiin vakiokäyttöolosuhteissa käyttöään aikana useiden pakkausikäytöjen tukemiseksi. Reagenssipakkaus pakastettiin ja sulatettiin useita kertoja ja testattiin, jotta voidaan tukea pakkauksen enintään 4:ää käyttökertaa. Lisäksi 8 RNA- ja 8 DNA -kirjastoa valmisteltiin yhteensä 3 kertaa tuettujen kirjastojen enimmäismäärän testaamiseksi (24 DNA- ja 24 RNA-kirjastoa pakkausta kohti). Kaikki toiminnallista pakkauksen vapauttamista koskevat kriteerit täytyivät kaikkien testattujen pakastus- ja sulatusjaksojen ja aikapisteiden osalta. FFPE-näytteitä testattiin reagensseilla, joiden ikä oli ≥ 25 kuukautta, käytössä olevan testauksen vaikutuksen arvioimiseksi varianttien tunnistukseen. Kohdevarianttien kvalitatiivinen analyysi osoittaa, että käyttökertatapahtumat eivät vaikuttaneet variantin tunnistukseen.

Nukleiinihappojen stabiilius

Nukleiinihappojen (DNA ja RNA) stabiilius ja niihin liittyvä kvantitointi TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kanssa käyttöä varten arvioitiin käyttämällä useiden kudostyyppien FFPE-näytteitä. FFPE-blokki jaettiin ja kaikki nukleiinihapot uutettiin kerralla. Uutettu nukleiinihappo sekoitettiin perusteellisesti, kvantifioitiin, tarkistettiin nukleiinihapon laadun osalta ja jaettiin kahteen sarjaan kertakäyttöisiä putkia, jotka jäädettiin kahden aikapisteen ajaksi: T0-kontrolli (lähtötaso) ja T1-testi (≥ 28 päivää). Kaikkea eristettyä RNA:tä säilytettiin -85 °C ...

65 °C:ssa ja kaikkea eristettyä DNA:ta säilytettiin -25...-15 °C:ssa ilmoitetun ajanjakson ajan ja prosessoitiin sitten TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä useilla rinnakkaisnäytteillä ja useiden käyttäjien toimesta. T1-testitilaa verrattiin kontrolliin MSI-tilan, TMB-pisteiden, geenimonistusten, pienten DNA-varianttien, RNA-fuusioiden ja RNA-liitosvarianttien osalta. Tiedot osoittavat, että nukleiinihapot ja niiden kvantitointi TSO Comprehensive (EU) -määrityksen avulla käyttöä varten ovat stabiileja enintään 28 päivän ajan, kun niitä säilytetään suositelluissa lämpötiloissa (RNA -85...-65 °C ja DNA -25...-15 °C).

Kirjaston stabiilius

Kutakin kuutta määrityksen turvallista pysähtymispistettä (katso [Taulukko 5](#)) käytettävän kirjaston stabiiliutta arvioitiin käyttämällä eri kudostyyppien FFPE-näytteitä. Kontrollikirjastot (T0, ei pysähtymispisteitä) sekvensoitiin välittömästi työnkulun loppuksi. Samojen kirjastojen alikvootteja pidettiin pysähtymispisteissä -25...-15 °C:ssa [Taulukko 5](#) ilmoitettuja päiviä vastaavan ajan (T1) verran. T1:tä verrattiin T0:aan pienten DNA-varianttien, TMB:n, geenimonistusten, MSI:n, RNA-fuusioiden ja RNA-liitosvarianttien sekä CDx-varianttien ja profiloinnin kasvainvarianttien osalta. Tiedot osoittavat, että TSO Comprehensive (EU) -määrityksestä luotujen kirjastojen stabiilius vastaa käyttöohjeita.

Objekttilasille preparoidun FFPE-kudoksen stabiilius

TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä käytettävän, objekttilasille preparoidun FFPE-kudoksen stabiiliutta arvioitiin leikkaamalla FFPE-näyteblokit (5 µm:n leikkeet) erilaisista yksilöllisistä näytteistä, jotka on valmistettu preparaateiksi objektilaseille, minkä jälkeen niitä säilytettiin huoneenlämpötilassa (22 °C) kahta aikapistettä varten. RNA uutettiin ja sitä säilytettiin -65...-85 °C:ssa ja DNA uutettiin ja sitä säilytettiin -15...-25 °C:ssa alle viikon ajan ennen testausta. Nukleiinihappomateriaali kvantifioitiin ja prosessoitiin sitten TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä 24 tunnin kuluessa kunkin aikapisteen osalta. Kussakin aikapisteessä useita rinnakkaisnäytteitä ja käyttäjiä näytettä kohti testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä ja verrattiin T0-aikapisteeseen MSI:n, TMB:n, geenimonistusten, pienten DNA-varianttien, RNA-fuusioiden ja RNA-liitosvarianttien, mukaan lukien CDx- ja kasvainprofilointivariantit, osalta. Variantt tunnistus arvioitiin ja täytti kaikki hyväksyntäkriteerit, mikä osoittaa, että TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kanssa käytettävät objekttilasille preparoidut FFPE-kudokset ovat stabiileja huoneenlämmössä enintään 4 viikon (28 päivän) ajan. On huomioitava, että MSI-kirjaston QC:n validointiasteessa havaittiin 10 %:n lasku 4 viikon (28 päivän) jälkeen käyttäjän ja säilytysajan yhdistelmästä johtuen. RNA:n fuusioita ja liitosvariantteja tukevien readien määrä väheni noin 29 %:lla, kun näytteitä oli säilytetty objektilaseilla 4 viikon (28 päivän) ajan.

Nukleiinihapon syötteen titrauksen varmistusrajat

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen nukleiinihapon syöte arvioitiin testaamalla DNA:ta 33 FFPE-näytteestä, jotka sisälsivät 17:ta kudostyyppiä, syötealueilla 10–500 ng, ja testaamalla RNA:ta 5 FFPE-näytteestä ja 5 kudostyyppistä syötealueilla 10–85 ng. Kirjaston QC-mittarit arvioitiin, ja ne olivat näyteriippuvaisia. DNA-tulokset osoittivat, että jotkin, mutta eivät kaikki, DNA-näytteen QC-mittarit reagoivat lisääntyneeseen syötteeseen 40 ng:n nimellissyötteen yläpuolella:

- MEDIAN_INSERT_SIZE ei reagoanut yli 30 ng:n syötteeseen.

- MEDIAN_EXON_COVERAGE osoitti positiivista korrelaatiota kasvavaan syötteeseen.
- PCT_EXON_50X kasvoi kasvaneen syötteen myötä aina 80 ng:aan asti.
- USABLE_MSI_SITES kasvoi kasvaneen syötteen myötä. Jotkin näytteet, joissa oli alle 40 USABLE_MSI_SITES 40 ng:ssä, saavuttivat ohjearvon korkeammilla syötteillä, mikä mahdollisti MSI-pisteiden laskennan.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET kasvoi syötteen kasvaessa.
- Kasvanut syöte kasvattaa COVERAGE_MAD:ia ylempää ohjearvorajaa kohti.

RNA-näytteen QC-mittarit kasvoivat (MEDIAN_INSERT_SIZE ja TOTAL_ON_TARGET_READS) tai vähenivät (MEDIAN_CV_GENE_500X) 10 ng:sta 40 ng:aan, mutta eivät yleisesti ottaen muuttuneet 40 ng:n ja 85 ng:n syötteen välillä.

Tyhjän raja

Väriä negatiivisten prosenttimäärä (odotetusta negatiivisten tulosten kokonaismäärästä) arvioitiin rinnakkaisnäytetestauksella, jossa käytettiin normaalia tai hyvänlaatuista viereistä FFPE-kudosta, jossa ei saanut olla somaattisia variantteja pienten DNA-varianttien, geenin monistumisten, MSI:n, RNA-fuusioiden ja RNA-liitosvarianttien osalta. Vääriä positiivisia tuloksia ei analysoitu TMB:n osalta, koska kliinistä rajaa ei ole. Kuusi DNA- ja 6 RNA-FFPE-näytettä ajettiin duplikaattina 2 käyttäjällä 3 päivänä kunkin 2 reagenssierän kohdalla. Näytteiden alajoukko poolattiin uudelleen ja sekvensoitiin uudelleen 3 x vain DNA- ja 3 x vain RNA -formaattina väriä positiivisten arvioimiseksi useilla multipleksointiasetuksilla, joita tämä laite tukee. Lisäksi 30 lisä-RNA-näytettä ajettiin duplikaattina, ja ne prosessoitiin 1 reagenssierän kanssa, joka oli jaettu 2 käyttäjän kesken. Yhteensä oli 168 mahdollista havaintoa DNA:lle ja 228 RNA:lle, joista vähennettiin kelvottomat kirjastot kunkin varianttityypin osalta. Väriä positiivisten tulosten prosenttiosuus laskettiin geenitasolla monistumisille ja aseman tasolla (noin 1,9 miljoonaa asemaa) pienille DNA-varianteille. Väriä positiivisten tulosten prosenttiosuus DNA-varianttityypeille on esitetty [Taulukko 46](#). TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä ei ole CDx:ää (taso 1) koskevia ilmoitettuja havaitsemisrajoja pienten DNA-varianttien osalta, joten väriä positiivisia tuloksia ei anneta pienille DNA-varianteille tasolla 1. 271 väärän positiivisen tuloksen tasaamiseen käytettiin TSO Comprehensive (EU) -tietokantaa. Mikään väärä positiivinen tulos ei ollut kliinisesti merkittävä (taso 2). Tasolla 3 oli 4 väärää positiivista tulosta, jotka koskivat kahta varianttia ja kahta havaintoa neljästä (2,4 %). Havaintoja oli yhteensä 168. Väriä positiivisten prosenttimäärä RNA-fuusiolle ja liitosvarianteille oli 0 % [Taulukko 47](#) mukaisesti.

Taulukko 46 Väärät positiiviset DNA-varianttityypeittäin

Varianttityyppi	Väärät positiiviset
Geenien monistumiset	0 % (0/9912)
Pienet DNA-variantit	0,0001 % (271/295 801 567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	Ei soveltu*

* Väriä positiivisia ei voida soveltaa, sillä TMB raportoidaan pisteinä, eikä sen tulos ole kvalitatiivinen.

Taulukko 47 Väärät positiiviset RNA-varianttityypin mukaan

Varianttityyppi	Väärät positiiviset
Fuusio	0 % (0/227)
Liitosvariantti	0 % (0/227)

Havaitsemisraja

Kaksi tutkimusta on tehty TSO Comprehensive (EU) -määrityksen havaitsemisrajojen arvioimiseksi. Tutkimuksessa 1 arvioitiin RET:n pienet DNA-variantit, RET-fuusiot ja NTRK1–3-fuusiot. Tutkimuksessa 2 arvioitiin muita kasvaimen profiloitavariantteja.

Tutkimus 1

NTRK1:n, NTRK3:n ja RET:n pienten DNA-varianttien ja NTRK1–3:n ja RET:n fuusioiden määrityksen havaitsemisrajat (LoD:t) määritettiin. LoD on matalin analyyttiarvo (esim. variantin alleelitaajuus tai tukevat readit), joka voidaan tunnistaa yhdenmukaisesti (95 %:n havaitsemisraja tai 5 %:n virhe tyyppissä II). Tutkimuksessa käytettiin FFPE-kudoksia, joissa oli RETin pieniä DNA-variantteja (medullaarinen kilpirauhassyöpä), RET-fuusioita (papillaarinen kilpirauhassyöpä, atyyppinen Spitzin kasvain) ja NTRK1–3 -fuusioita (matalan graduksen gliooma, glioblastooma multiforme, myofibroblastinen sarkooma, sarkooma, sekretorinen rintasyöpä, koolonsyöpä), sekä FFPE-käsiteltyä solulinjaa, jossa on NTRK1:n ja NTRK3:n pieniä DNA-variantteja. Kukin näyte laimennettiin vähintään 5 testitasoon (noin välillä 0,01–0,10 VAF pienten DNA-varianttien osalta ja noin 2–25 tukevaa readia fuusioiden osalta). Kullekin variantille ja erälle oli 18 havaintoa kullakin testitasolla. Ne on luonut 3 käyttäjää ja 3 sekvensointi-instrumenttia, jotka käynnistivät kirjaston valmistelun 3 ei-peräkkäisenä päivänä ja 2:lla kunkin näytetestitason rinnakkaisnäytteellä. Kaksi reagenssierää testattiin.

DNA-varianttien kohdalla 2 erää analysoitiin itsenäisesti käyttämällä probittiregressiota tai osumamäärän lähestymistapaa (alhaisin testitaso osumamäärällä [piste-estimaatti] $\geq 95\%$) kunkin variantin eräkohtaisen LoD:n määrittämiseksi. Kahden reagenssierän suurempi LoD otettiin havaitsemisrajaksi kyseiselle variantille ([Taulukko 48](#)).

RNA-fuusioille käytettiin FFPE-solulinjoja kunkin fuusiogeenin LoD-arvojen arvioimiseksi. Tämän jälkeen LoD:it varmennettiin FFPE-kudoksilla käyttämällä duplikaatteja kirjastopreparaatteja 3 käyttäjällä, 3 laitteella ja 3 reagenssierällä, jotta saatiin 54 varianttikohtaista havaintoa lähellä LoD:ia, joka määritettiin FFPE-sukulinjoilla. Kaikkien fuusioiden ilmoitetut havaitsemisrajat ([Taulukko 49](#)) ovat vähäisimmät keskiarvoa tukevat readit, jotka saavuttivat osumamäärän (piste-estimaatti) $\geq 95\%$.

Taulukko 48 NTRK1:n, NTRK3:n ja RET:n pienten DNA-varianttien havaitsemisraja

Markkeri	Chr ¹	Sijainti	Viite	Vaihtoehtoinen	Havaitsemisraja (variantin alleelitaajuus)
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 (deleetio) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

¹ Chr = kromosomi

* Näiden DNA-varianttien analysoinnissa käytettiin probittiregressiota; muiden DNA-varianttien analysoinnissa käytettiin osumamäärän lähestymistapaa.

Taulukko 49 NTRK- ja RET-fuusioiden määrittämisen havaitsemisraja

Geeni	Fuusio	Havaitsemisraja (tukevat readit)
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

Geeni	Fuusio	Havaitsemisraja (tukevat readit)
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6
	CCDC6-RET	18,7

Tutkimus 2

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen raportoimien kasvaimen profiloitavarianttien havaitsemisrajat (LoD:t) arvioitiin. LoD on alhaisin analyysiarvo (variantin alleelitaajuus, kertamuutos tai tukevat readit), joka voidaan tunnistaa yhtäpitävästi (95 %:n osumamäärä tai 5 %:n tyyppin II virhe). Variantteja sisältäviä FFPE-näytteitä 17 kudostyyppistä laimennettiin useisiin testitasoihin. Kaksi käyttäjää loi kuusi havaintoa tasoa kohti; kumpikin käytti eri reagenssierää ja laitetta.

DNA-variantit

10 pienen DNA-variantin luokan LoD:t (yhteensä 25 varianttia) ja 2 DNA-geenin monistumiset (ERBB2 ja MET) määritettiin ja koottiin yhteen alueina ([Taulukko 50](#)). Mukana on myös RET-variantit tutkimuksen 1 havaitsemisrajasta. Kahden 3:sta insertiosta, jotka ovat yli 5 bp, LoD:t olivat 0,034 ja 0,036 VAF, ja kolmannen LoD oli 0,215 VAF. Jälkimmäinen oli insertio alhaisen kompleksisuuden alueella, jolla insertio lisää lisätoistoja, vaikuttaa kohdistukseen ja edellyttää lisäreadeja yhdenmukaista tunnistamista varten. Näin ollen jotkin alhaisen kompleksisuuden genomikontekstit saattavat vaikuttaa > 5 bp:n insertioiden tunnistamiseen.

Taulukko 50 Havaitsemisraja pienille DNA-varianteille ja geenin monistumisille

Tyyppi (LoD:n mittayksikkö)	Varianttiluokka/genomikonteksti	Varianttien lukumäärä	Vaihteluväli (VAF)
Pienet DNA-variantit (variantin alleelitaajuus)	SNV:t	5	0,016–0,064
	MNV:t	3	0,022–0,048
	Insertio (1–2 bp) homopolymeeritoistojen lähellä	2	0,086–0,104
	Insertio (1–2 bp) dinukleotiditoistojen lähellä	2	0,038–0,051
	Insertio (3–5 bp)	2	0,030–0,056
	Insertio (> 5 bp ja enintään 25 bp)	3	0,034–0,215
	Deleetio (1–2 bp) homopolymeeritoistojen lähellä	2	0,094–0,100
	Deleetio (1–2 bp) dinukleotiditoistojen lähellä	2	0,033–0,070
	Deleetio (3–5 bp)	2	0,028–0,064
Deleetio (> 5 ja enintään 25 bp)	2	0,047–0,055	
Geenimonistukset (kertamuutos)	Geenikohtaisesti (ERBB2, MET)	2	1,539, 1,570

Ei-kohdennettujen varianttien analyysiin käytettiin tutkimuksen 1 näytteitä, joilla oli vähintään viisi testaustasoa. Kaikki ei-kohdennetut variantit analysoitiin erikseen. Havaitsemisraja arvioitiin vain niille varianteille, joilla oli vähintään yksi > 0 %:n taso ≤ 95 %:n osumamäärällä ja vähintään yksi taso, johon liittyvä osumamäärä oli ≥ 95 %. [Taulukko 51](#) esitetään prosenttipisteet sekä luokkakohtaisesti havaitut LoD:n ala- ja ylärajat ei-kohdennettujen varianttien osalta. Varianttiluokkiin kuuluvien ei-kohdennettujen varianttien määrä on suurempi kuin tutkimuksessa 2 testattujen varianttien määrä. LoD:t vastaavat [Taulukko 50](#) annettuja arvoja.

Taulukko 51 Havaitsemisrajojen tiivistetyt tilastot ei-kohdistettujen varianttien luokan mukaan (tutkimuksesta 1)

Luokka	N	Vähimm.	25 %	50 %	75 %	90 %	Enimm.
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
Insertio	24	0,039	0,060	0,084	0,097	0,166	0,261
Deleetio	24	0,034	0,063	0,081	0,089	0,124	0,167

Fuusiot

LoD:t määritettiin 19 fuusion osalta, jotka kattavat yhteensä 20 TSO Comprehensive (EU) -paneelin geeniä. LoD:t vaihtelivat välillä 9–31,3 tukevaa readia (Taulukko 52). Lisäksi 3 geeniä (NTRK1–3) testattiin toisessa tutkimuksessa. RET-geeni testattiin sekä tässä että toisessa tutkimuksessa. Kuudentoista fuusion, joiden LoD:t oli määritetty, tiedot olivat yhteneväisiä yleisten 16 tukevan readin LoD:n kanssa, kun käytetään kaksipuolista 95 %:n ylemmää luottamusväliä (UCL). Kahdella fuusiolla oli 24,7 ja 31,3 tukevan readin LoD:t, jotka eivät olleet yhtäpitäviä yleisen LoD:n kanssa.

Fuusiolla FGFR2-SRPK2, jonka LoD-arvo oli 24,7 tukevaa readia, oli toistuvia päällekkäisiä alueita katkoskohdassa, kuten TSO Comprehensive (EU) -määritysohjelmisto merkitsi. Katkoskohdan sisällä olevilla toistoalueilla on tyypillisesti pienemmät näytön tasot, sillä readit voivat kartoittua muualle genomiin tai pysyä kohdistumattomina. Lisäksi toistoalueet tekevät kokoonpanoprosessista (jota käytetään fuusion sekvenssien tunnistamiseen) haastavampaa ja edellyttävät lisänäyttöä oikean sekvenssin luomiseen. SEPT14-EGFR on toinen esimerkki fuusiosta, jonka katkoskohdassa on homologinen sekvenssi.

Fuusiolla BCL2-IGHJ5, jonka LoD-arvo on 31,3 tukevaa readia, on hyvin lyhyt geeni (IGHJ5), ja sen katkoskohta on lähellä eksonin alkua, mikä edellyttää aukollisia lyhyitä kohdistuksia. Tämän seurauksena yhtäpitävä tunnistus edellyttää enemmän readeja.

Taulukko 52 Fuusioiden määrityksen havaitsemisraja

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

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

Liitosvariantit

Kahden RNA-liitosvariantin (MET ja EGFR) LoD:t olivat 18,7 ja 16,7 tukevaa readia.

Kasvainsisältö

Tutkimuksen tulokset antavat tietoa suosituksia varten kliinisten näytteiden kasvainsisällön osalta. Yleisesti ottaen: mitä suurempi kasvainsisältö, sitä korkeampi kasvainten varianttien "signaali" (VAF, kertamuutos tai tukevat readit) on. Minimikasvainsisällön suositukset perustuvat seuraaviin havaintoihin. LoD-arvot pienille DNA-varianteille ovat enintään 0,104 VAF (poikkeuksena TP53-insertio). Kasvaimen ajajamutaatioiden havaitsemiseksi (variantin alleelitaajuus 0,50) suositellaan 20 %:n kasvainsisältöä, jotta näiden mutaatioiden VAF:it olisivat 0,10 VAF ja jotta ne olisivat vähintään LoD:n tasolla. Kun kasvainsisältö on 20 %, 5,5-kertaisen muutoksen mukaan monistetut geenit (11 kopiota), havaittaisiin yhtäpitävästi 1,8-kertaisen muutoksen havaitsemisrajan perusteella. Kun kasvainsisältö on 20 %, fuusiot, joissa on 74 tukevaa readia, havaittaisiin yhtäpitävästi 14,7 tukevan readin havaitsemisrajan perusteella.

Toistettavuus

Tehtiin kaksi tutkimusta TSO Comprehensive (EU) -määrityksen toistettavuuden arvioimiseksi. Tutkimuksessa 1 arvioitiin RET:n pieniä DNA-variantteja ja NTRK- ja RET-fuusiovariantteja. Tutkimuksessa 2 arvioitiin muita kasvaimen profiloitavariantteja.

Tutkimus 1

Tämä tutkimus suoritettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen toistettavuuden arvioimiseksi 3 testauspaikassa (1 sisäistä, 2 ulkoista), 2 käyttäjää testipaikassa, 2 ajon sisäisellä rinnakkaisnäytteellä ja 3 ei-peräkkäisenä testauspäivänä. Testaus tehtiin toistettavuuspaneelilla, joka sisälsi DNA-näytteitä, joissa oli erityisiä tunnettuja RET:n pieniä DNA-variantteja ja RNA-näytteitä, jotka sisälsivät erityisiä tunnettuja NTRK1–3- ja RET-fuusiovariantteja, formaliiniin fiksoiduista ja parafiiniin valetuista (FFPE) kudoksenäytteistä ja solulinjoista. Paneeli sisälsi DNA- ja RNA-paneeliosia, joilla on matalat varianttitasot ja korkeat varianttitasot samalla määrällä matalan ja korkean tason paneeliosia kullekin varianttiluokalle. Korkean tason paneelijäsenet kohdennettiin noin 2–3 kertaiseen LoD-arvoon ja matalan tason paneeliosat kohdennettiin noin LoD-arvoon. Kukin käyttäjä testasi paneelin osia kussakin toimipaikassa duplikaattina 3 kertaa, jolloin saadaan 6 havaintoa kohdetta ja paneelin osaa kohti. Kaikista 3 toimipaikasta luotiin 36 havaintoa paneelin osaa kohti (3 toimipaikkaa/instrumenttia × 2 käyttäjää × 2 ajon sisäistä toistoa × 3 aloituspäivää).

Kohteena olevien pienten DNA-varianttien ja RNA-fuusiovarianttien korkean tason PPC:t ja PNC:t määritettiin ensisijaisiksi päätetapahtumiksi. Kohteena olevien pienten DNA-varianttien ja RNA-fuusiovarianttien PPC:t ja PNC:t alhaisella tasolla määritettiin toissijaisiksi päätetapahtumiksi. Kaikkiin päätetapahtumiin liittyvät kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit (CI) laskettiin Wilsonin pisteytysmenetelmällä. Kohdennettujen korkean tason paneelin osien PPC:n ja PNC:n arvioimiseksi suoritettiin ensisijaisia analyysejä (yhdessä niihin liittyvien 95 %:n CI:n kanssa) yhdistämällä sovellettavaa versioluokkaa edustavan paneelin osien ryhmän tietyn kohteen TSO Comprehensive (EU) -määritys (esim. pienet DNA-variantit ja RNA-fuusiot) kaikissa toimipaikoissa/instrumenteissa, kaikilla käyttäjillä ja kaikissa ajoissa. Kunkin kohdennetun variantin kohdalla TSO Comprehensive (EU) -määrityksen havainnot muiden korkean tason paneelin osissa saman varianttityypin osalta, joka ei kuitenkaan sisällä samaa varianttia kuin enemmistöä koskevassa säännössä on määritetty, yhdistettiin laskettuun PNC:hen. Alhaisen tason kohdennettujen paneelin osien kokonais-PPC ja -PNC määritettiin samalla tavalla.

RET:n pienet DNA-variantit

Korkean tason pienen DNA-variantin paneeliosille kokonais-PPC oli 100,0 % (207/207; 95 %:n CI: 98,2 % – 100,0 %) ([Taulukko 53](#)). Korkean tason pienen DNA-variantin paneeliosille kokonais-PNC oli 100,0 % (1 035/1 035; 95 %:n CI: 99,6 % – 100,0 %) ([Taulukko 54](#)). Matalan tason kohdennettujen pienten DNA-variantin paneeliosien osalta kokonais-PPC matalan tason kohdennetuille pienen DNA-variantin paneeliosille oli 99,1 % (210/212; 95 %:n CI: 96,6 % – 99,7 %) ja kokonais-PNC oli 100,0 % (1 026/1 026; 95 %:n CI: 99,6 % – 100,0 %).

Taulukko 53 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PPC RET:n pienten DNA-varianttien tunnistamiseksi korkean ja matalan tason kohdennetuille paneeliosille

Varianttitaso	Varianttityyppi	Kohdennettu variantti (nukleotidi)	Kohdennettu variantti (aminohappo)	N	Keskimääräinen VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI ²
~2–3 x 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)
	Deleetio	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 (33/33)	(89,6, 100,0)
	Insertio	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
	Kaikki korkeat pienet DNA-variantit	Kaikki korkeat pienet DNA-variantit	Kaikki korkeat pienet DNA-variantit	207	N/A ¹	100,0 (207/207)	(98,2, 100,0)
	~1 x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 (35/35)
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)
Deleetio		chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0 (34/34)	(89,8, 100,0)
Insertio		chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
Kaikki matalat pienet DNA-variantit		Kaikki matalat pienet DNA-variantit	Kaikki matalat pienet DNA-variantit	212	N/A ¹	99,1 (210/212)	(96,6, 99,7)

¹ Lyhenteet: –, ei sovellettavissa; VAF, variantin alleelitaajuus.

² Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 54 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PNC RET:n pienten DNA-varianttien tunnistamiseksi korkean ja matalan tason kohdennetuille paneeliosille

Varianttitaso	Varianttityyppi	Kohdennettu variantti (nukleotidi)	Kohdennettu variantti (aminohappo)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 %:n CI ²
~2-3 x 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)
	Deleetio	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 (174/174)	(97,8, 100,0)
	Insertio	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 (171/171)	(97,8, 100,0)
	Kaikki korkeat pienet DNA-variantit	Kaikki korkeat pienet DNA-variantit	Kaikki korkeat pienet DNA-variantit	1035	100,0 (1 035/1 035)	(99,6, 100,0)
~1 x 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)
	Deleetio	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0 (178/178)	(97,9, 100,0)
	Insertio	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0 (176/176)	(97,9, 100,0)
	Kaikki matalat pienet DNA-variantit	Kaikki matalat pienet DNA-variantit	Kaikki matalat pienet DNA-variantit	1026	100,0 (1 026/1 026)	(99,6, 100,0)

¹ Kaikki havainnot, jotka on poolattu paneelin osa-variantti-yhdistelmistä, joissa suurin osa tunnistuksista on negatiivisia (kohdennettuja variantteja sisältävät fuusiot, joissa alle 50 % tunnistuksista on positiivisia).

² Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 55 näyttää variantin alleelitaajuuksien (VAF:t) varianssikomponenttien analyysin noin 36 havainnossa kullekin paneeliosalle. Keskihajonta (SD) ja variaatiokertoimen prosentti (% CV; yhteensä ja kullekin lähteelle) laskettiin ja esiteltiin kullekin kohdennetulle RET:n pienelle DNA-variantille.

Taulukko 55 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen VAF:n varianssikomponenttien analyysi kohdennettujen pienten DNA-varianttien paneeliosille

Varianttitaso	Varianttityyppi	Kohdennettu variantti (nukleotidi)	Kohdennettu variantti (Aminohappo)	N	VAF:n keskiarvo	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän SD (% CV)	Päivän SD (% CV)	Rinnakkaisnäytteen SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
~2–3 x 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)
	Deleetio	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)
	Insertio	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (9,6)	0,010 (10,1)
~1 x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,009 (22,2)	0,009 (22,2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0)	0,003 (9,8)	0,002 (6,2)	0,007 (21,7)	0,008 (24,6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,008 (17,5)	0,008 (18,5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0)	0,008 (10,7)	0,000 (0,0)	0,011 (14,9)	0,013 (18,4)
	Deleetio	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)
	Insertio	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8)	0,000 (0,0)	0,003 (9,1)	0,006 (15,9)	0,008 (22,9)

NTRK 1–3 ja RET-fuusiot

Korkean tason RNA-fusion paneeliosissa kokonais-PPC oli 99,3% (285/287; 95 %:n CI: 97,5 % – 99,8 %) (Taulukko 56). PPC oli 100 % kullekin korkean tason paneeliosalle, poikkeuksena BCAN-NTRK1-paneeliossa (PPC = 94,4 % [34/36; 95 %:n CI: 81,9 % – 98,5 %]). Kokonais-PNC korkean tason RNA-fusion paneeliosissa oli 100,0 % (1 724/1 724; 95 %:n CI: 99,8 % – 100,0 %) (Taulukko 57). Matalan tason kohdennetuissa RNA-fusion paneeliosissa kokonais-PPC oli 95,4 % (272/285; 95 %:n CI: 92,3 %, 97,3 %) ja kokonais-PNC oli 100,0 % (1 851/1 851; 95 %:n CI: 99,8 % – 100,0 %).

Taulukko 56 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PPC NTRK- ja RET-fuusioiden tunnistamiseksi korkean ja matalan tason kohdennetuissa paneeliosissa

Varianttitaso	Kohdennettu fuusio	N	Keskimääräiset tukevat readit	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI*
~2–3 x 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)
	Kaikki korkeat fuusiot	287	36,5	99,3 (285/287)	(97,5, 99,8)
~1 x 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)
	Kaikki matalat fuusiot	285	16,8	95,4 (272/285)	(92,3, 97,3)

* Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli (CI) Wilsonin pisteytysmenetelmällä laskettuna.

Taulukko 57 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PNC NTRK- ja RET-fuusioiden tunnistamiseksi korkean ja matalan tason kohdennetuissa paneeliosissa

Variantti taso	Kohdennetut fuusiot	N ¹	PNC (%) (n/N)	95 %:n CI ²
~2–3 x 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)
	Kaikki fuusiot - korkea	1724	100,0 (1 724/1 724)	(99,8, 100,0)
~1 x 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)
	Kaikki fuusiot - matalat	1851	100,0 (1 851/1 851)	(99,8, 100,0)

¹ Kaikki havainnot, jotka on poolattu paneelin osa-variantti-yhdistelmistä, joissa suurin osa tunnistuksista on negatiivisia (kohdennettuja variantteja sisältävät fuusiot, joissa alle 50 % tunnistuksista on positiivisia).

² Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli (CI) lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 58 näyttää tukevien readien varianssikomponenttien analyysin noin 36 havainnossa jokaiselle kohdennetulle fuusiolle. SD ja % CV (yhteensä ja kullekin lähteelle) laskettiin ja esitettiin kullekin kohdennetulle fuusiolle.

Taulukko 58 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tukevien readien varianssikomponenttien analyysi kohdennetun RNA-fuusion paneeliosille

Varianttitaso	Fuusio	N	Keskimääräiset tukevat readit	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän SD (% CV)	Päivän SD (% CV)	Rinnakkaisnäytteen SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
~2-3 x 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)
~1 x 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)

Tutkimus 2

Toinen tutkimus suoritettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen toistettavuuden arvioimiseksi 3 testipaikassa (2 ulkoista ja 1 sisäinen), 2 käyttäjä/laitetta kussakin paikassa, 3 ainutkertaista reagenssierää, 4 testipäivää (ei peräkkäistä) ja 2 sekvensointiajoa näytekirjastoa kohden.

Testaus tehtiin käyttämällä uutettuja DNA- ja RNA-näytteitä 41 FFPE-kudosnäytteistä ja 1 FFPE solulinjasta (1 FFPE-kudosnäytettä ja FFPE-solulinjaa käytettiin luomaan 2 paneelin osaa kullekin). Kudosnäytteisiin kuuluivat seuraavat tyypit: rakko, luu, aivo, rinta, koolon, tyhjäsuoli, munuainen, maksa, keuhko, munasarja, eturauhanen, iho, pehmytkudos, mahalaukku, kilpirauhanen ja kohtu. Yhteensä 44 paneelin osaa testattiin, mukaan lukien DNA-paneelin osat, joissa on pieniä DNA-variantteja (SNV:t, MNV:t, insertiot ja deleetiot), geenin monistumiset, eri TMB-pisteet, korkeat MSI-pisteet ja RNA-paneelin osat, joissa on fuusioita ja liitosvariantteja. Useimpien paneelin osien tunnettujen kohdevarianttien tasot olivat noin 2-3-kertaiset varianttikohtaiseen määrityksen havaitsemisrajaan nähden (~2-3 x LoD).

LoD on analyysin pitoisuus, jossa havaitut määritystulokset ovat positiivisia (tunnistettu variantti suhteessa TSO Comprehensive (EU) -määrityksen rajaan) $\geq 95\%$ ajasta. Keskimääräiset havainnoidut varianttitasot luokiteltiin noin $< 2 \times \text{LoD}$ (havaitut varianttitasot arvolla $< 1,5 \times \text{LoD}$), $\sim 2-3 \times \text{LoD}$ (havaitut varianttitasot arvolla $1,5 \times \text{LoD} - 3,4 \times \text{LoD}$) ja noin $> 3 \times \text{LoD}$ (havaitut varianttitasot arvolla $> 3,4 \times \text{LoD}$).

PPC:t pienille DNA-varianteille, geenin monistumisille, MSI-Korkea -parametrille ja RNA-varianteille laskettiin yhdistämällä eri sekvensointiajojen ja testipaikkojen havaintoja. PNC:t laskettiin samoin pienille DNA-varianteille, geenin monistumisille ja RNA-varianteille. Kunkin tunnetun kohdevariantin kohdalla yhdistettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen saman varianttityypin paneeliosia, jotka sisältävät muita variantteja, joita ei ole johdettu samasta lähdennyksestä ja jotka eivät täytä kyseisen variantin enemmistöä koskevaa sääntöä (< 50 % tunnistuksista oli positiivisia) eri testipaikkojen, käyttäjien/laitteiden, päivien, reagenssierien ja sekvenssiajojen suhteen. Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit (CI) laskettiin Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Pienet DNA-variantit

Taulukko 59 näyttää PPC:t kohdennetuille pienille DNA-varianteille. PPC:t vaihtelivat BRAF SNV:n 91,3 prosentista pienten DNA-varianttien suurimman osan 100 prosenttiin.

Taulukko 59 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PPC pienten DNA-varianttien tunnistamiseksi yhdistetyissä kohdennetuissa paneeliosissa

Havaittu varianttitas ^{o1}	Varianttityyppi	Kohdennettu variantti (nukleotidi)	Kohdennettu variantti (aminohappo)	Keskimääräinen VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI ³
~2–3 x LoD	DELEETIO	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 (28/28)	(87,9, 100,0)
~2–3 x LoD	DELEETIO	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 (40/40)	(91,2, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTIO	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTIO	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
< 2 x LoD	INSERTIO	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 (4/4)	(51,0, 100,0)
~2–3 x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 (42/46)	(79,7, 96,6)
~2–3 x LoD	DELEETIO	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGC_A_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)

Havaittu varianttitas ^{o1}	Varianttityyppi	Kohdennettu variantti (nukleotidi)	Kohdennettu variantti (aminohappo)	Keskimääräinen VAF ²	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI ³
~2–3 x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2–3 x LoD	DELEETIO	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTIO	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0,075	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2–3 x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
~2–3 x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 (38/38)	(90,8, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTIO	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3 x LoD	DELEETIO	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 (44/44)	(92,0, 100,0)
< 2 x LoD	INSERTIO	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0,157	100,0 (2/2)	(34,2, 100,0)
~2–3 x LoD	INSERTIO	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Varianttitaso laskettu keskimääräisestä havaitusta variantin alleelitaajuudesta.

² Keskimääräinen variantin alleelitaajuus laskettu havaittujen määritysten tuloksista.

³ Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

PNC:t olivat 100 % pienissä DNA-varianteissa.

Taulukko 60 näyttää VAF-tulosten varianssikomponenttianalyysin kullekin variaation lähteelle ja kokonaisvariaation kaikissa paneeliosissa kohdennetuilla DNA-varianteilla.

Taulukko 60 Kohdennettujen pienten DNA-varianttien VAF:ien varianssikomponenttianalyysi

Kohdennettu variantti (nukleotidi)	N	VAF:n keskiarvo	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV)	Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Ajon SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	46	0,112	0,000 (0,0)	0,004 (3,8)	0,015 (13,7)	0,005 (4,1)	0,008 (6,9)	0,018 (16,3)
chr7_55259515_T_G	38	0,045	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,012 (27,3)	0,000 (0,0)	0,003 (6,8)	0,013 (28,8)
chr7_140453136_A_T	46	0,045	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,016 (34,9)	0,000 (0,0)	0,006 (12,2)	0,017 (36,9)
chr7_140453136_AC_TT	46	0,130	0,000 (0,0)	0,004 (2,9)	0,017 (13,4)	0,003 (2,6)	0,006 (4,9)	0,019 (14,8)
chr9_139399350_C_CG	48	0,146	0,015 (10,2)	0,000 (0,0)	0,012 (8,2)	0,000 (0,0)	0,004 (2,8)	0,020 (13,4)
chr10_89720798_GTACT_G	44	0,157	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,021 (13,6)	0,002 (1,6)	0,010 (6,4)	0,024 (15,3)
chr12_25398284_CC_AT	38	0,111	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (16,8)	0,003 (2,5)	0,008 (7,3)	0,020 (18,5)
chr17_7574002_CG_C	44	0,158	0,007 (4,2)	0,000 (0,0)	0,021 (13,5)	0,013 (8,6)	0,013 (8,2)	0,029 (18,4)
chr17_7574029_C_CGGAT	48	0,154	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (11,0)	0,006 (3,8)	0,010 (6,6)	0,021 (13,4)
chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	36	0,075	0,013 (16,9)	0,006 (8,1)	0,013 (16,7)	0,000 (0,0)	0,004 (4,7)	0,019 (25,5)
chr22_41574678_GC_G	44	0,245	0,006 (2,4)	0,002 (0,6)	0,019 (7,9)	0,000 (0,0)	0,005 (2,1)	0,021 (8,6)

Kahden pienen DNA-kohdennetun variantin havaintojen lukumäärä oli liian pieni varianssikomponenttien mallin käyttöön. Näiden kahden kohdennetun variantin kohdalla yleinen keskihajonta oli 0,027 variantille chr1_27024001_C_CG ja 0,001 variantille chr17_7578470_C_CGGCGG.

Geenien monistumiset

Taulukko 61 näyttää PPC:t kohdennetuille geenien monistumisille. PPC:t olivat 100,0 % MET:lle ja 100,0 % ERBB2:lle.

Taulukko 61 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PPC geenien monistumisten tunnistukselle yhdistetyissä kohdennetuissa paneeliosissa

Havaittu varianttitaso ¹	Kohdennettu variantti	Keskimääräinen havaittu kertamuutos ²	Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%)	95 %:n CI ³
~2–3 x LoD	MET	5,14	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3 x LoD	ERBB2	2,33	100,0 (47/47)	(92,4, 100,0)

¹ Varianttitaso laskettuna keskiarvoisesta havaitusta kertamuutoksesta.

² Keskimääräinen kertamuutos laskettuna havaituista määritystuloksista.

³ Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

PNC:t olivat 100 % kaikissa geenien monistumisissa.

Taulukko 62 näyttää kertamuutostulosten varianssikomponenttien analyysin kullekin variaation lähteelle ja kokonaisvariaation kaikissa paneeliosissa kohdennetuilla geenimonistuksilla.

Taulukko 62 Kertamuutoksen varianssikomponenttien analyysi kohdennetuille geenimonistuksille

Kohdennettu variantti	N	Keskimääräinen kertamuutos	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV)	Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Ajon SD (% CV)	SD yhteensä (% 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

Taulukko 63 näyttää PPC:t kohdennetuille MSI-Korkea-paneeliosille. PPC:t olivat 100 % molemmille MSI-Korkea-paneeliosille.

Taulukko 63 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PPC MSI-Korkea-tilan tunnistamiseksi yhdistetyissä kohdennetuissa paneeliosissa

Paneeliosa	Keskimääräiset MSI-pisteet ¹	N	Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%)	95 %:n CI ²
TPSBD4	60,5	36	100,0 (36/36)	(90,4, 100,0)
TPSBD6	55,7	32	100,0 (32/32)	(89,3, 100,0)
Kaikki osat		68	100,0 (68/68)	(94,7, 100,0)

¹ Keskimääräiset havaitut MSI-pisteet laskettuina havaituista määritystuloksista.

² Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 64 näyttää MSI-pisteiden tulosten varianssikomponenttianalyysin kullekin variaation lähteelle ja kokonaisvariaatiolle kaikkien niiden paneeliosien osalta, jotka on kohdennettu MSI-Korkea-tilaan.

Taulukko 64 Kohdennettujen MSI-Korkea-paneeliosien MSI-pisteiden varianssikomponenttien analyysi

Paneeliosa	N	Keskimääräiset MSI-pisteet	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV)	Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Ajon SD (% CV)	SD yhteensä (% 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

TMB-pisteiden toistettavuuden arvioimiseksi pisteille tehtiin kvantitatiivinen analyysi kohdennetuissa TMB-paneeliosissa, jotka edustivat odotettujen TMB-pisteiden aluetta. **Taulukko 65** näyttää varianssikomponenttianalyysin MSI-pisteiden tuloksille kullekin variaation lähteelle ja kokonaisvariaation kaikissa paneeliosissa. TMB-pisteiden kokonaiskeskihajonta oli 1,0 (% CV = 13) yhdelle paneeliosalle (keskimääräiset TMB-pisteet = 7,6) ja 1,1 (% CV = 2) toiselle paneeliosalle (keskimääräiset TMB-pisteet = 63,2).

Taulukko 65 TMB-pisteiden varianssikomponenttien analyysi kohdennetuille TMB-paneeliosille

Paneeliosa*	N	TMB-pisteiden keskiarvo	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV)	Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Ajon SD (% CV)	SD yhteensä (% 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)

* Oli 1 TMB-paneeliosa, jolle havaintojen lukumäärä oli liian pieni ($N = 2$) varianssikomponenttien mallin käyttöön. Tämän paneeliosan kokonaiskeskihajonta oli 1,7.

RNA-variantit

Taulukko 66 näyttää kohdennettujen RNA-varianttien PPC:t. PPC:t vaihtelivat KIF5B-RET:n 91,7 prosentista RNA-varianttien suurimman osan 100 prosenttiin.

Taulukko 66 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PPC RNA-varianttien tunnistamiseksi yhdistetyissä kohdennetuissa paneeliosissa

Havaittu varianttitaso ¹	Varianttityyppi	Kohdennettu variantti	Keskimääräiset tukevat readit ²	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI ³
> 3 x LoD	Fuusio	ACPP-ETV1	44,7	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuusio	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuusio	CD74- ROS1;GOPC	56,6	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuusio	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuusio	EML4-ALK	49,3	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuusio	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuusio	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
~2–3 x LoD	Fuusio	DHX8;ETV4- STAT3	48,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuusio	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuusio	FGFR1-GSR	61,1	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
	Fuusio	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuusio	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuusio	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuusio	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)
	Fuusio	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 (47/48)	(89,1, 99,6)

Havaittu varianttitaso ¹	Varianttityyppi	Kohdennettu variantti	Keskimääräiset tukevat readit ²	PPC (%) (n/N)	95 %:n CI ³
< 2 x LoD	Fuusio	KIF5B-RET	11,6	91,7 (44/48)	(80,4, 96,7)
	Fuusio	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
> 3 x LoD	Liitosvariantti	EGFR vIII	64,0	100,0 (46/46)	(92,3, 100,0)
~2–3 x LoD	Liitosvariantti	MET-eksoni 14:n ohitus	61,2	100,0 (48/48)	(92,6, 100,0)

¹ Varianttitaso laskettuna keskiarvoisista tukevista readeista.

² Keskimääräiset tukevat readit laskettuna havaituista määritystuloksista.

³ Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

PNC oli 100 % kullekin kohdennetulle RNA-variantille, poikkeuksena FGFR2-SRPK2-fuusiolle (PNC = 99,60 % (984/988; 95 %:n CI: 98,96 % – 99,84 %)).

Taulukko 67 näyttää tukevien readitulosten varianssikomponenttianalyysin kullekin variaation lähteelle ja kokonaisvariaation kaikissa paneeliosissa kohdennetuilla RNA-varianteilla.

Taulukko 67 Kohdennettujen RNA-varianttien tukevien readien varianssikomponenttianalyysi

Kohdennettu variantti	N	Keskimääräiset tukevat readit	Testipaikan SD (% CV)	Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV)	Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Ajon SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR vIII - liitosvariantti	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
MET-eksonin 14:n ohituksen silmutointivariantti	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Laboratorion sisäinen tarkkuus

Tehtiin kaksi tutkimusta laboratorion sisäisen tarkkuuden arvioimiseksi TSO Comprehensive (EU) -määritykselle. Tutkimuksessa 1 arvioitiin NTRK- ja RET-fuusioita ja RET:n pieniä DNA-variantteja. Tutkimuksessa 2 arvioitiin TMB:tä ja MSI:tä.

Tutkimus 1

Laboratorion sisäinen tarkkuus arvioitiin NTRK1–3-fuusioiden (matalan graduksen gliooma, glioblastooma multiforme, myofibroblastinen sarkooma, sekretorinen rintasyöpä), RET-fuusioiden (kilpirauhassyöpä ja ihokudos tuntemattomasta syövästä) ja RET:n pienten DNA-varianttien (medullaarinen kilpirauhassyöpä) osalta osoitetuista syövästä saaduista FFPE-kudoksista. Kukin näyte testattiin kahdella varianttitasolla: ~1 x LoD (matala varianttitaso) ja ~2–3 x LoD (korkea varianttitaso), poikkeuksena näyte, jossa oli CCDC6-RET ja joka testattiin vain matalalla varianttitasolla. Kukin näytteistä kullakin testitasolla ajettiin duplikaatteina kussakin

kirjaston valmistelutapahtumassa kolmen (3) käyttäjän kautta. Kukin käyttäjä aloitti kirjaston valmistelun kolmena (3) ei-peräkkäisenä aloituspäivänä ja sekvensoi kolmella (3) tähän varatulla NextSeq 550Dx -laitteella. Kolme (3) reagenssierää testattiin, ja havaintoja saatiin 54 tasoa kohden. Joillakin tasoilla oli alle 54 havaintoa kelvottomien kirjastojen vuoksi.

Kvalitatiivinen analyysi

Variantin tunnistuksen kvalitatiivinen yhtäpitävyys arvioitiin erikseen kahden varianttitason osalta tietyille variantille poolatuista havainnoista kaikkien muuttujien yli (käyttäjät, reagenssierät, instrumentit, päivät ja rinnakkaisnäytteet). PPC:t ja PNC:t ja niihin liittyvät kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit (Wilson-pisteet) on koottu [Taulukko 68](#) (pienet DNA-variantit) ja [Taulukko 69](#) (RNA-fuusiot).

Korkealla varianttitasolla (~2–3 x LoD) TSO Comprehensive (EU) -määritys osoitti 100 % PPC:lle ja PNC:lle kaikkien testattujen varianttien osalta.

Matalalla varianttitasolla (~1x LoD) pienten DNA-varianttien PPC vaihteli välillä 83,3 % – 98,1 %, ja PPC RNA-fuusioille vaihteli välillä 90,7 % – 100 %. Varianteille, joiden PPC < 95 %, VAF:ien keskiarvo (RET C634Y ja RET D898_E901del) tai tukevat readit (NCOA4-RET ja BCAN-NTRK1) olivat vastaavien havaitsemisrajojen alapuolella. Matalalla varianttitasolla 100 %:n PNC saavutettiin kaikille varianteille.

Taulukko 68 Kvalitatiiviset tulokset kohdennetuille DNA-varianteille

Varianttitaso	Variantti	Varianttityyppi	VAF:n keskiarvo	PPC (%) (n/N) (95 %:n CI)	PNC (%) (n/N) (95 %:n CI)
~1 x 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	DELEETIO	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*	DELEETIO	0,056	98,1 (53/54) (90,2, 99,7)	100,0 (215/215) (98,2, 100,0)

Varianttitaso	Variantti	Varianttityyppi	VAF:n keskiarvo	PPC (%) (n/N) (95 %:n CI)	PNC (%) (n/N) (95 %:n CI)
~3 x 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	DELEETIO	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*	DELEETIO	0,161	100,0 (32/32) (89,3, 100,0)	100,0 (214/214) (98,2, 100,0)

* Kunkin variantin nukleotidimuutokset on lueteltu määrityksen havaitsemisrajan osiossa, poikkeuksena RET D631_L633delinsE, joka on kromosomi 10, sijainti 43609940, viite ACGAGCT, vaihtoehto A.

Taulukko 69 Kohdennettujen RNA-fuusioiden kvalitatiiviset tulokset

Varianttitaso	Fuusio	Keskimääräiset tukevat readit	PPC (%) (n/N) (95 %:n CI)	PNC (%) (n/N) (95 %:n CI)
~1 x LoD	TPM3-NTRK1	20,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4 (51/54) (84,9, 98,1)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	LMNA-NTRK1	12,2	98,1 (51/52) (89,9, 99,7)	100,0 (539/539) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (591/591) (99,4, 100,0)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (537/537) (99,3, 100,0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE-solulinja)	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 (näyte 1)	17,3	95,4 (103/108) (89,6, 98,0)	100,0 (430/430) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (näyte 2)	17,3	96,2 (51/53) (87,2–99,0)	

Varianttitaso	Fuusio	Keskimääräiset tukevat readit	PPC (%) (n/N) (95 %:n CI)	PNC (%) (n/N) (95 %:n CI)
~2–3 x 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-solulinja)	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	Ei sovellu	Ei testattu	100,0 (589/589) (99,4, 100,0)
	KIF5B-RET (näyte 1)	43,8	100,0 (54/54) (93,4, 100,0)	100,0 (428/428) (99,1, 100,0)
	KIF5B-RET (näyte 2)	44,6	100,0 (53/53) (93,2, 100,0)	

Kvantitatiivinen analyysi

Rajoitetun enimmäistodennäköisyyden (REML) varianssikomponenttien analyysi suoritettiin jatkuvien taustamuuttujien kokonaisvariaation arvioimiseksi (VAF pienille DNA-varianteille ja tukevat readit RNA-fuusioille) ja tarkkuuskomponenttien arvioimiseksi [keskihajonta (SD), variaatiokerroin (CV)] kullekin variaation lähteelle [käyttäjät, laitteet, päivät, reagenssierät, jäännös ja yhteensä]. [Taulukko 70](#) esittää tulokset pienille DNA-varianteille ja [Taulukko 71](#) RNA-fuusioille.

VAF:n variaatio kasvoi keskiarvon myötä, kuten odotettua binomisuhteessa. Tukevien readien variaatio kasvoi keskiarvon myötä odotetusti laskentatiedoilla. Jäännöskomponentti vaikutti eniten kokonaisvariassiin sekä pienten DNA-varianttien että RNA-fuusioiden kohdalla molemmilla tasoilla tukien päätelmää siitä, että näiden varianttien tunnistus TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä on vakaata käyttäjille, erille, laitteille ja päiville.

Taulukko 70 Kvantitatiiviset SD- ja CV-tulokset kohdennetuille pienille DNA-varianteille

VAF-taso	Variantti	Varianttityyppi	Pätevien yritysten lkm	VAF:n keskiarvo	Käyttäjän SD (% CV)	Laitteen SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Päivän SD (% CV)	Jäännöksen SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
~1 x LoD	RET D898_E901del	DELEETIO	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	DELEETIO	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)
~3 x LoD	RET D898_E901del	DELEETIO	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	DELEETIO	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)

Taulukko 71 Kvantitatiiviset SD- ja CV-tulokset kohdennetuille RNA-fuusioille

Tukevien readien taso	Fuusio	Pätevien yritysten lkm	Keskimmääiset tukevat readit	Käyttäjän SD (% CV)	Laitteen SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Päivän SD (% CV)	Jäännöksen SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
~1 x 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 (solulinja)	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 (näyte 1)	108	17,3	2,11 (12)	2,50 (14)	2,89 (17)	3,52 (20)	7,09 (41)	9,04 (52)
	KIF5B-RET (näyte 2)	53	17,3	2,05 (12)	3,72 (22)	3,65 (21)	2,41 (14)	5,95 (34)	8,52 (49)

Tukevien readien taso	Fuusio	Pätevien yritysten lkm	Keskimääräiset tukevat readit	Käyttäjän SD (% CV)	Laitteen SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Päivän SD (% CV)	Jäännöksen SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
2-3 x 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 (solulinja)	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 (näyte 1)	54	43,8	4,15 (9)	0,96 (2)	12,57 (29)	6,52 (15)	15,23 (35)	21,23 (48)
	KIF5B-RET (näyte 2)	53	44,6	5,37 (12)	4,97 (11)	13,73 (31)	0,00 (0)	12,41 (28)	19,90 (45)

Tutkimus 2

Laboratorion sisäinen tarkkuus arvioitiin TMB:lle ja MSI:lle. Viittä NSCLC FFPE DNA -näytettä TMB:lle ja seitsemää CRC FFPE -näytettä MSI:lle, mukaan lukien sekä MS-Stabiili että MSI-Korkea, käytettiin tarkkuuden arvioimiseksi eri tasoilla pisteiden koko alueella. Kolme (3) käyttäjää ajoi kunkin näytteen kahtena kappaleena kolmena (3) päivänä käyttäen kolmea (3) kirjastopreparaattia ja kolmea (3) reagenssierää. Ajoissa käytettiin kolmea NextSeq 550Dx -laitetta, jolloin saatiin 54 tasokohtaista havaintoa.

Kvalitatiivinen yhtäpitävyys arvioitiin MSI-tilan osalta. TSO Comprehensive (EU) -määritys osoitti 100-prosenttisen yhtäpitävyyden positiivisten tunnistusten prosenttimäärän ja negatiivisten tunnistusten prosenttimäärän osalta MSI-tilalle. TMB:lle TSO Comprehensive (EU) -määritys raportoi TMB-pisteet: kvalitatiivinen yhtäpitävyys ei ole sovellettavissa.

TMB- ja MSI-pisteiden kokonaisvariaatio sekä lähdekohtainen kontribuutio (laitteet, käyttäjät, erät, päivät ja jäämä) kvantifioitiin käyttämällä varianssikomponenttien mallia pisteiden koko alueella. [Taulukko 72](#) näyttää keskihajonnan (SD) ja variaatiokerroimen (CV) TMB:lle ja [Taulukko 73](#) MSI:lle tasokohtaisesti. Joillakin tasoilla oli alle 54 havaintoa kelvottomien kirjastojen vuoksi.

Taulukko 72 Kvantitatiivisten TMB-pisteiden SD- ja CV-tulokset

Taso	TMB-pisteiden keskiarvo	Pätevien yritysten lkm	Käyttäjän SD (% CV)	Laitteen SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Päivän SD (% CV)	Jäännöksen SD (% CV)	SD yhteensä (% 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)

Taulukko 73 Kvantitatiiviset MSI-pisteiden SD- ja CV-tulokset

MSI-tila	Taso	Keskimääräiset MSI-pisteet (%)	Pätevien yritysten lkm	Käyttäjän SD (% CV)	Laitteen SD (% CV)	Erän SD (% CV)	Päivän SD (% CV)	Jäännöksen SD (% CV)	SD yhteensä (% CV)
MS-Stable (MS-Stabiili)	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-Korkea	L3	48,68	53	0,19 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	1,19 (2)	2,48 (5)	2,76 (6)
	L4	56,85	54	1,66 (3)	0,00 (0)	1,92 (3)	0,00 (0)	3,07 (5)	3,98 (7)
	L5	72,62	54	0,00 (0)	0,47 (1)	0,34 (0)	0,62 (1)	1,28 (2)	1,54 (2)
	L6	75,29	54	0,00 (0)	0,42 (1)	0,09 (0)	0,00 (0)	1,46 (2)	1,52 (2)
	L7	78,38	54	0,00 (0)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,45 (1)	0,95 (1)	1,06 (1)

TMB-pisteiden variaatio kasvaa yleensä keskiarvon myötä odotetusti laskettujen tietojen teoreettisista jakaumista. MSI-pisteiden variaatio tasoille, jotka ovat lähellä MSI-pisteitä = 50, ovat suurempia kuin MSI-pisteiden variaatio lähempänä 0:aa tai 100:aa, yhdenmukaisesti teoreettisten jakaumien vaihtelevuuden kanssa. Jäännöskomponentti pysyi suurimpana kokonaisvarianssin aiheuttajana sekä MSI- että TMB-pisteille, mikä tukee päätelmää, että pisteet ovat vakaita käyttäjille, erille, laitteille ja päiville. Sekä MSI että TMB ovat kuitenkin monimutkaisia biomarkkereita ja analyttinen suorituskyky voi vaihdella näytekohtaisesti. Tämä tarkoittaa, että TMB-variaatio ei riipu vain TMB-arvosta, mutta myös näytteen varianttien koostumuksesta, kuten varianttityypistä (SNV, Indel) ja VAF-tasosta (inklusiiorajan läheisyys). Samoin MSI-variaatio ei riipu vain MSI-arvosta, vaan myös näytekohtien koostumuksesta, kuten instabiilien kohtien lukumäärästä ja instabiiliuden määräästä kohtaa kohti.

C5- ja C95-arvot 20,00 %:n rajan lähellä määritettiin MSI:lle käyttämällä tarkkuusprofiilia (Taulukko 74).

Taulukko 74 C5–C95-välit MSI:lle

Pisteet	C5	C95
MSI	17,17 %	23,32 %

Kasvainsisällön vaikutus TMB- ja MSI-pisteisiin arvioitiin. Useimmissa näytteissä kasvainsisällöllä ≥ 30 % oli merkityksetön vaikutus TMB-pisteisiin, kun määränä oli yli noin 10 megaemästä/mutaatio. TMB-pisteet pysyivät suhteellisen muuttumattomina kasvainsisällön kasvaessa. MSI-Korkea-näytteissä kasvainsisältö korreloi positiivisesti ja lineaarisesti MSI-pisteiden kanssa. MSI-Korkea-näytteet pysyvät keskimäärin MSI-Korkeana, kun kasvainsisältö oli ≥ 30 %. Endometriaaliset näytteet käyttäytyivät selvästi eri tavalla kuin muut kudostyyppit. Kasvainsisältöä tarvittiin enemmän, jotta ne voitiin tunnistaa MSI-Korkeaksi.

Kasvaimen profiloinnin tarkkuus

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen varianttien tunnistamista verrattiin viitemenetelmien tuloksiin. DNA:n pieniä variantteja ja TMB:tä vertailtiin ulkoiseen validoituun koko eksomin NGS-menetelmään. Geenimonistuksia vertailtiin samaan koko eksomin NGS-menetelmään tai validoituun in situ -kaksoishybridisaation (DISH) menetelmään, joka on tarkoitettu HER2:n monistumisille. MSI:tä arvioitiin suhteessa validoituun MSI-PCR-testiin. RNA-silmukointivariantteja vertailtiin validoituun kvantitatiivisen PCR:n (qPCR) menetelmään. ROS1- ja

ALK-fuusioita vertailtiin validoituihin FISH-määrittäisiin. Kaikkia muita fuusioita verrattiin yhdistelmämenetelmään, johon kuului validoitu RNA:n koko eksomin NGS-määrittäminen (RNGS1), kohdennettu NGS-paneeli (RNGS2) ja droplet-digital-PCR (ddPCR).

Pienen DNA-variantin tunnistus

Pienten DNA-varianttien tunnistusta TSO Comprehensive (EU) -määrittäyksellä vertailtiin koko eksomin sekvensoinnin tuloksiin (WES), jossa käytetään WESiä kaltaistettujen kasvain-normaali-näyteparien kanssa ituradan ja somaattisen pienen variantin tunnistukseen. Pienten varianttien välinen vertailu, joka koostui yksittäisistä nukleotidivarianteista (SNV), insertioista ja deleetioista, perustui 124 näytteeseen 14:stä eri kudostyyppistä, jotka olivat kelvollisia sekä TSO Comprehensive (EU) -määrittäykselle että WES:lle. TSO Comprehensive (EU) -määrittäminen pystyi havaitsemaan monen nukleotidin variantteja (MNV, 2–3 bp), jotka vaativat phasing-erottelua, mutta WES-määrittäminen ei pystynyt. TSO Comprehensive (EU) MNV:t arvioitiin yksittäisinä SNV:inä suhteessa WES:ään. [Taulukko 75](#) esittää yhteenvedon yhtäpitävyydestä varianttitasolla, mukaan lukien positiivisen yhtäpitävyyden prosentin (PPA) ja negatiivisen yhtäpitävyyden prosentin (NPA) kaikille varianttien tunnistuksille.

Taulukko 75 Yhtäpitävyyden yhteenvedo varianttintunnistuksille, jotka on arvioitu ituradan tai somaattisen tilan mukaan

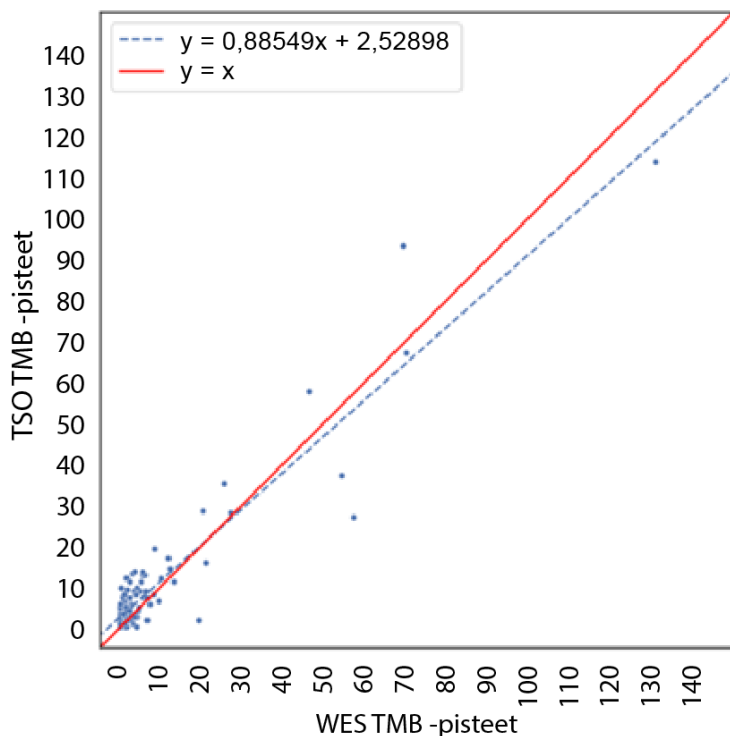
	WES-somaattinen tunnistettu	WES Germline tunnistettu	WES ei tunnistettu
TSO Comprehensive (EU) tunnistettu	382	33 163	426
TSO Comprehensive (EU) ei tunnistettu	69	61	70 000 481
Yhteensä	451	33 224	70 000 907
Yhtäpitävyyden prosentti	PPA: 85 % (382/451) 95 %:n CI: [81 %, 87 %]	PPA: > 99 % (33 163/33 224) 95 %:n CI: [99,8 %, 99,9 %]	NPA: > 99 % (70 000 481/70 000 907) 95 %:n CI: [99,999 %, 99,999 %]

TSO Comprehensive (EU) tunnistoi yhteensä 426 somaattista varianttia, joita WES-menetelmä ei tunnistanut. Kahdellasadalla neljällä (48 %) näistä varianteista oli variantin alleelitaajuuksia, jotka olivat WES-menetelmän tunnistamisen kynnyksarvon alapuolella. Jäljellä olevissa potentiaalisesti väärin positiivisten varianteissa oli näyttöä variantin tunnistuksesta WES-menetelmässä matalalla tuella. Lisäksi monella variantilla oli hyvin alhaisen tason WES-näyttö kaltaistetuissa normaaleissa näytteissä. Tämä viittaa siihen, että WES ei huomannut näitä variantteja kasvaimessa kasvaimen normaalikontaminaation vuoksi.

Kasvaimen mutaatiokuorman tunnistus

TMB:n yhtäpitävyys määritettiin vertailemalla TMB-pisteitä (somaattiset mutaatiot / megaemäs) WES-menetelmän ja TSO Comprehensive (EU) -menetelmän välillä 124 näytteelle, joista oli saatavilla tiedot sekä TSO Comprehensive (EU) -määrittelylle että WES:ille. Lineaarisella regressioanalyysillä, jossa WES oli ennustavana muuttujana, oli y-leikkauspisteenä 2,53, kulmakertoimenä 0,89 ja Pearsonin korrelaatiokerrotimeksi 0,94 (Kuva 3).

Kuva 3 TMB:n pisteiden korrelaatio WES- ja TSO Comprehensive (EU) -määrittelyn välillä



Geenien monistumisen tunnistus

TSO Comprehensive (EU) -määrittelyn geenien monistumisen tunnistamista vertailtiin saman WES-määrittelyn tuloksiin käyttämällä joko kasvaimen normaaleja vastaavia näytteitä tai vain kasvaimen näytteitä. Näytteitä oli yhteensä 420, joista 183:a käytettiin ortogonaalisessa kasvain/normaali-menetelmässä ja 237:ssä käytettiin pelkkää kasvaimen menetelmää. 420 näytteestä 50 näytettä valittiin tutkimukseen onnistuneen kohdesekvenssin monistuksen perusteella. Analyysissä käytettiin joko TSO Comprehensive (EU) -määrittelyä tai sen edeltäjää. Luonnehdittujen näytteiden suorituskyvyn mittareita mukautettiin käyttämällä keskimääräistä fuusioprevalenssia. Luonnehdittujen ja luonnehtimattomien näytteiden yhdistetty suorituskyky laskettiin käyttämällä käänteisen varianssin painotettua keskiarvoa. Näytteet olivat 14 kudostyyppistä, ja ne sisälsivät 55 geenin monistumisia. TSO Comprehensive (EU) ilmoittaa geenien monistumiset MET- ja ERBB2-geeneistä. Tarkkuus arvioitiin kuitenkin kaikille 55 geenille. [Taulukko 76](#) esittää yhteenvedon geenien monistumisen tunnistamisesta.

Taulukko 76 Geenimonistusten yhtäpitävyyden yhteenveto

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

* Luottamusväli on laskettu bootstrap-menetelmällä.

ERBB2 (HER2) -monistumiset mahalaukun ja rinnan kudoksissa analysoitiin erikseen muista geenien monistumisista käyttämällä in situ -kaksoishybridisaatiomenetelmää (DISH). Yhteensä 116 rinnan ja mahalaukun näytettä testattiin; näistä 64 oli aiemmin luonnehdittu HER2-positiiviseksi IHC:llä ja FISH:llä. Yhden näytteen uuttaminen epäonnistui, 4 näytettä epäonnistui TSO Comprehensive (EU) -määrityksen validoinnissa ja 3 näytettä epäonnistui DISH-määrityksen validoinnissa. 108 näytteestä 20:n (18,5 %) pisteet olivat rajalla (1,5–2,5) DISH-määrityksen raja-arvon 2,0 tuntumassa. [Taulukko 77](#) esittää yhtäpitävyyden tulokset (mukaan lukien PPA ja NPA) kaikille näytteille, sekä tulokset, joista on jätetty pois HER2 DISH -rajatapaukset.

Taulukko 77 Yhtäpitävyyden yhteenveto TSO Comprehensive ja HER2 DISH:n välillä, myös HER2-geenin monistumiselle

HER2-geenin monistuminen Kaikki (rinta ja mahalauku)	HER2 DISH monistunut	HER2 DISH ei monistunut
TSO Comprehensive (EU) -positiivinen	17 (mukaan lukien 1 rajatapaus)	13 (mukaan lukien 1 rajatapaus)
TSO Comprehensive (EU) -negatiivinen	10 (mukaan lukien 6 rajatapausta)	68 (mukaan lukien 12 rajatapausta)
Yhtäpitävyysprosentti, rajatapaukset mukaan lukien	PPA: 63 % (17/27) 95 %:n CI: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95 %:n CI: [74 %, 90 %]
Yhtäpitävyysprosentti, rajatapaukset pois lukien	PPA: 80 % (16/20) 95 %:n CI: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95 %:n CI: [72 %, 90 %]

Mikrosatelliitti-instabiiliuden tunnistus

Mikrosatelliitti-instabiiliuden tunnistamista TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä vertailtiin sellaisen validoidun MSI-PCR-testin tuloksiin, jossa käytetään kaltaistettuja kasvainnäytteitä ja normaaleja näytteitä testauksessa. Vertailuun otettiin yhteensä 195 näytettä, jotka täyttivät vaaditun kasvainsisällön: ≥ 30 % (MS-Stabiili-tilan osalta). Näytteet edustivat 14 eri kudostyyppiä. MSI-PCR:llä arvioidaan 5 kohtaa, ja sillä on 3 tulosta — MS-Stabiili (ei epästabiileja kohtia), MSI-Matala (yksi epästabiili kohta) ja MSI-Korkea (vähintään kaksi epästabiilia kohtaa). TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä voidaan arvioida enintään 130 mikrosatelliittikohtaa, ja näytteet voidaan luokitella vain MSS-Stabiili- tai MSI-Korkea-kohteiksi (≥ 20 % epästabiileja kohtia). MSI-Matala-tulokset ryhmitettiin MSS-tulosten kanssa MSI-PCR-menetelmää varten. [Taulukko 78](#) esittää yhtäpitävyyksanalyysin.

Taulukko 78 Yhtäpitävyysanalyysin yhteenveto TSO Comprehensive (EU) -määrittelyn ja MSI-PCR:n välillä DNA:n mikrosatelliitti-instabiiliudelle

MSI-tila	PCR MSI-Korkea	PCR MSI-Matala	PCR MSI-Stabiili
TSO Comprehensive (EU) epästabiili (MSI-Korkea)	41	2	0
TSO Comprehensive (EU) stabiili (MS-Stabiili)	3	0	150
Yhteensä	44	2	150
Yhtäpitävyysprosentti	PPA: 93 % (41/44) 95 %:n CI: [82 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95 %:n CI: [95 %, > 99 %]	

RNA:n silmukointivariantin tunnistus

Liitosvariantin tunnistuksen tarkkuus laskettiin vertailemalla TSO Comprehensive (EU) -määrittelyn tuloksia qPCR-määrittelyyn EGFRvIII:lle ja MET-eksoni 14:n ohitukselle, mukaan lukien yksi tunnettu positiivinen RNA kullekin liitosvariantille. Yhtäpitävyysanalyysi tehtiin yhteensä 230:sta FFPE RNA -näytteestä ja 14:sta kudostyyppistä, joista oli saatavilla tiedot sekä TSO Comprehensive (EU)- että viitemenetelmällä. Kaikki näytteet testattiin MET-eksoni 14:n ohituksen osalta, kun taas EGFRvIII testattiin vain aivokudoksessa. Kolmella näytteellä, jotka tunnistettiin positiivisiksi MET-eksoni 14:n ohituksen osalta qPCR:llä, mutta ei TSO Comprehensive (EU) -määrittelyllä, Ct-keskiarvo oli > 37, ja ne alittivat TSO Comprehensive (EU) -määrittelyn LoD-tason. [Taulukko 79](#) esittää yhteenvetona yhtäpitävyyden tulokset.

Taulukko 79 Yhtäpitävyysanalyysin yhteenveto TSO Comprehensive (EU) -määrittelyn ja qPCR:n määrittelyn välillä RNA-silmukointivarianteille

RNA-silmukointivariantit	qPCR-positiivinen	qPCR-negatiivinen
TSO Comprehensive (EU) -positiivinen (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) -negatiivinen (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (EU) -positiivinen (MET-eksoni 14:n ohitus)	1	0
TSO Comprehensive (EU) -negatiivinen (MET-eksoni 14:n ohitus)	3	217
Yhteensä	7	230
Yhtäpitävyysprosentti	PPA: 57 % (4/7) 95 %:n CI: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95 %:n CI: [98 %, 100 %]

RNA-fuusion tunnistus

Vertailu yhdistelmämenetelmään

TSO Comprehensive (EU) -fuusioita vertailtiin yhdistelmämenetelmään, johon kuului NGS-paneelilla (RNGS1) tehtävä RNA:n koko eksomin sekvensointi, kohdennettu NGS-fuusiopaneeli (RNGS2) ja droplet-digital-PCR-menetelmä (ddPCR).

RNGS1-menetelmä on päällekkäinen kaikkien sellaisten geenien osalta, joissa TSO Comprehensive (EU) kykenee tunnistamaan fuusioita. RNGS1-menetelmän detektoriraja oli kuitenkin 4–8-kertainen suhteessa TSO Comprehensive (EU) -määrityksen vastaavaan, joka perustui päällekkäisissä fuusiotunnistuksissa havaittujen tukevien readien määrään. Näin ollen WES (RNGS1) -menetelmän kanssa käytettiin yhdistelmämenetelmää kahdella lisämenetelmällä, joilla on suurempi herkkyys, mutta vähemmän laajuutta fuusioiden osalta.

RNGS1:llä testattiin yhteensä 255 ainutkertaista RNA-näytettä, jotka käsittivät 14 kudostyyppiä ja jotka läpäisivät TSO Comprehensive (EU) -mittarit. Kaksi näytettä oli mitätöityjä RNGS1-näytteen QC:n osalta, ja ne poissuljettiin lisäanalyysistä. TSO Comprehensive (EU) -sovelluksen tunnistamista 82 fuusiosta 4 poissuljettiin arvioinnista RNGS1-näytteen QC-vikojen vuoksi, ja 7:ää muuta fuusiota ei voitu tunnistaa, sillä kohteet puuttuivat RNGS1-paneelistä. Jäljelle jääneistä TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tunnistamista 71 fuusiosta RNGS1 vahvisti 9 fuusiota. RNGS1 tunnistasi 4 fuusiota, joita TSO Comprehensive (EU) ei tunnistanut.

62 fuusiosta, jotka olivat TSO Comprehensive (EU) -positiivisia ja joita RNGS1 ei tunnistanut, 13 oli päällekkäisiä ja RNGS2:n vahvistamia. Yhden fuusion tunnistasi RNGS2, mutta ei TSO Comprehensive (EU).

Tämän jälkeen droplet-digital-PCR-menetelmää käytettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tunnistamille fuusioille, joita RNGS1 ei tunnistanut tai ei voinut tunnistaa ja joita RNGS2 (49) ei voinut arvioida. Lisäksi ddPCR:ää käytettiin 2/4 väärän negatiivisen fuusion uudelleenarviointiin TSO Comprehensive (EU) -määritykselle RNGS1:llä ja 2/9 yhtäpitävän fuusion uudelleenarviointiin TSO Comprehensive (EU) -määritykselle ja RNGS1:lle. Viisi fuusion negatiivista näytettä sisällytettiin kunkin positiivisen fuusionäytteen testaukseen tarkkuuden takaamiseksi. Kahdeksaatoista fuusiota ei testattu ddPCR:llä, koska alukkeita/koettimia tai useita geenipareja fuusiolle ei voinut suunnitella tai jäljellä olevan FFPE-materiaalin riittämättömyyden vuoksi. ddPCR:n osalta alukkeet ja koettimet oli suunniteltu TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä havaittuja katkoskohtia vastaan.

ddPCR tunnistasi yhteensä 52 fuusiota, ja niistä TSO Comprehensive (EU) tunnistasi 41, joita RNGS1 ei kuitenkaan tunnistanut tai ei kyennyt tunnistamaan. ddPCR tunnistasi yhdeksän fuusiota, jotka olivat kuitenkin negatiivisia TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä tai RNGS1:ssä. Kaksi ddPCR:n positiivista fuusiota vahvistivat 2 yhtäpitävää fuusiota TSO Comprehensive (EU) -määrityksen ja RNGS1:n osalta. ddPCR ei havainnut yhtään fuusiota 2 uudelleenarvioitulle TSO Comprehensive (EU) -määrityksen väärälle negatiiviselle RNGS1:llä; nämä laskettiin kuitenkin vääriksi negatiivisiksi RNGS1:n vertailun perusteella.

255 näytteestä 35 näytettä valittiin tutkimukseen, koska ne olivat positiivisia fuusion suhteen. Analyysissä käytettiin joko TSO Comprehensive (EU) -määritystä tai sen edeltäjää. Luonnehdittujen näytteiden suorituskyvyn mittareita mukautettiin käyttämällä keskimääräistä fuusioprevalenssia. Luonnehdittujen ja luonnehtimattomien näytteiden yhdistetty suorituskyky laskettiin käyttämällä käänteisen varianssin painotettua keskiarvoa. [Taulukko 80](#) esitetään fuusioiden yhdistetyt yhtäpitävyytulokset.

66 fuusiota (54 ainutkertaista fuusiosta), jotka olivat yhteneväisiä yhdistelmämenetelmän kanssa, edustivat 43:a geeniä TSO Comprehensive (EU) -paneelissa. Vain [Taulukko 80](#) mainittuihin 23 geeniin liittyvät fuusiot voidaan raportoida.

Taulukko 80 RNS-fuusioiden yhtäpitävyyden yhteenveto

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

* Luottamusväli on laskettu bootstrap-menetelmällä.

Vertailu FISH-menetelmään ROS1- ja ALK-fuusioille

FISH-menetelmällä testattiin kaksikymmentäviisi NSCLC-näytettä sekä ROS1- että ALK-fuusioiden osalta. 5 NSCLC:n lisänäytettä testattiin vastaavasti ROS1-fuusioiden osalta. Kahdeksan näytettä epäonnistui FISH-menetelmällä ROS1:n osalta riittämättömän kudoksen vuoksi. Sekä TSO Comprehensive (EU) että FISH tunnistivat kaksi ROS1-fuusiota ja yhden ALK-fusion. Eriäviä tuloksia ei havaittu. [Taulukko 81](#) on yhteenveto ROS1- ja ALK-fuusioiden yhtäpitävyytuloksista TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä ja FISH-menetelmällä.

Taulukko 81 Yhteenveto ROS1- ja ALK-fuusioiden yhtäpitävyytuloksista TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä ja FISH-menetelmällä

ALK+ROS1	FISH -menetelmän positiivinen	FISH -menetelmän negatiivinen
TSO Comprehensive (EU) - positiivinen	3	0
TSO Comprehensive (EU) - negatiivinen	0	44
Yhteensä	3	44
Yhtäpitävyysprosentti	PPA: 100 % (3/3) 95 %:n CI: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95 %:n CI: [92 %, 100 %]

Näytteen kelpoisuus

Näytteen kelpoisuus (ensimmäinen yritys) mitattiin 181 ainutkertaiselle RNA- ja 272 ainutkertaiselle DNA-näytteelle FFPE-näyteblokeista, jotka olivat ≤ 5 vuoden ikäisiä. Nämä näytteet valittiin kudostyyppin ja saatavilla olevan materiaalin perusteella: määrityksen validiteetti oli tuntematon. Kirjaston QC:n mittareiden tulee läpäistä varianttityyppi, jotta ne ovat kelpoisia. Näytteen kelpoisuudet arvioitiin erikseen kullekin varianttityypille (pienet DNA-variantit / TMB, MSI, geenien monistumiset, fuusiot/liitosvariantit), ja ne esitetään [Taulukko 82](#). On odotettavissa, että ≤ 2 vuoden ikäisten FFPE-blokkien MSI-kelpoisuus laskee 1 %:lla reagenssien toimituksesta johtuen.

Taulukko 82 Näytteen kelpoisuus

Varianttityyppi	Näytteen kelpoisuus
Fuusiot/liitosvariantit (RNA)	76 %
Pienet DNA-variantit / TMB	75 %
MSI	72 %
Geenin monistuminen	94 %

Yhteenveto analyttisestä validoinnista kasvaimen profiloitaväittämille

TSO Comprehensive (EU) validoidaan analyttisesti havaitsemisrajan, tarkkuuden, toistettavuuden ja tarkkuustietojen perusteella seuraaville:

- Pienet DNA-variantit — SNV:t, MNV:t, insertiot ja deleetiot.
- TMB
- MSI
- MET- ja ERBB2 (HER2) -geenin monistumiset (katso [Taulukko 2](#)).
- 23 geeniä, joiden fuusiot voidaan tunnistaa (katso [Taulukko 2](#)).
- EGFR- ja MET-liitosvariantit (katso [Taulukko 2](#)).

NTRK, kliininen suorituskyky

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen validoimiseksi kytkö diagnostiikaksi (CDx) potilaiden valintaan VITRAKVI-hoitoa varten (larotrektrinibi) larotrektrinibin kliinisiin tutkimuksiin osallistuneiden potilaiden näytteitä (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, joihin viitataan yhteisesti larotrektrinibin tutkimusnäytteinä) – yhdessä kaupallisesti hankittujen FFPE-kudosnäytteiden kanssa – testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tarkkuustutkimuksen ja kliinisen vertailututkimuksen tukemiseksi. Käytetty tietojen katkaisupäivä oli 15. heinäkuuta 2019.

NCT02122913 oli monikeskuksinen avoin vaiheen 1 annoslisäystutkimus aikuispotilaissa, joilla oli pitkälle kehittyneitä kiinteitä kasvaimia (kaikki tutkittavat) ja joita ei ollut valittu NTRK-fusion positiiviseksi syöväksi. Tutkimuksen annoslisäyksen jälkeen annoksen lisäys aloitettiin potilaille, joilla oli dokumentoitu NTRK-fusion positiivinen syöpä, ja potilaille, joiden tutkija uskoi saattavan hyötyä erittäin selektiivisestä TRK-inhibiittorista. NAVIGATE NCT02576431 on jatkuva monikeskuksinen avoin vaiheen 2 koritutkimus vähintään 12-vuotiailla potilailla, joilla on uusiutuvia pitkälle kehittyneitä kiinteitä kasvaimia ja joiden dokumentoitu NTRK-fusio on ulkopuolisen laboratorion arvioima. SCOUT NCT02637687 on jatkuva monikeskuksinen avoin vaiheen 1/2 tutkimus pediatriisille potilaille, vastasyntyneistä 21-vuotiaisiin, joilla on kiinteä tai primääri keskushermoston (CNS) kasvain.

NTRK-fuusion positiivisista potilaista, jotka sisältyivät TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tutkimukseen, 164 muodosti larotrektrinibin laajennetun ensisijaisen tehokkuuden sarjan (ePAS4).

Tarkkuustutkimus NTRK1-, NTRK2- ja NTRK3-fuusion tunnistamiseksi

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tarkkuus NTRK-fuusioiden tunnistamiseksi (NTRK1, NTRK2 tai NTRK3) potilaissa, joilla on kiinteitä kasvaimia, osoitettiin arvioimalla NTRK-fuusion tuloksia TSO Comprehensive (EU) -määrityksen ja validoidun ortogonaalisen menetelmän välillä NGS-sekvenssoinnin perusteella.

Toteutettiin retrospektiivinen ei-interventionaalinen tutkimus. Larotrektrinibitutkimusnäytteet ja lisänäytteet testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä yhdessä ulkoisessa tutkimuskeskuksessa ja ortogonaalisella menetelmällä keskuslaboratoriossa. TSO Comprehensive (EU) -määritysten NTRK-fuusiotunnistusten tarkkuus arvioitiin suhteessa ortogonaaliseen menetelmään; positiivinen yhtäpitävyysprosentti (PPA), negatiivinen yhtäpitävyysprosentti (NPA) ja liittyvät kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit (CI:t) laskettiin.

516 näytettä testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä ja/tai ortogonaalisella menetelmällä. Näistä näytteistä 499 testattiin molemmilla menetelmillä. Seitsemäätoista 516 näytteestä ei testattu yhdellä määrityksistä epäonnistuneen uuttamisen, tuntemattoman syyn (ortogonaalisen menetelmän kohdalla) tai protokollan poikkeaman vuoksi. Molemmilla menetelmillä testatuista 499 näytteestä 170 (34,1 %) oli larotrektrinibitutkimusnäytteitä ja 329 (65,9 %) oli lisänäytteitä.

499 näytteen tulokset on ristiin taulukoitu [Taulukko 83](#). Niistä 499 näytteestä 85 näytteellä oli virheellisiä TSO Comprehensive (EU) -määritystuloksia; näistä 85:stä 53 näytti myös virheellisiä ortogonaalisen menetelmän tuloksia. Ylimääräisillä seitsemällä näytteellä oli kelvottomat ortogonaalisen menetelmän tulokset. Näin ollen 407 näytteellä 499 näytteestä oli kelvolliset tulokset molemmissa menetelmissä.

Taulukko 83 NTRK-tarkkuustutkimus: NTRK-tarkkuustutkimus: TSO Comprehensive (EU) -tuloksen ristiinvalidointi suhteessa ortogonaalisen menetelmän tulokseen NTRK-fuusiotunnistuksen osalta

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tulos	NTRK-fuusion positiivinen	Ortogonaalisen menetelmän tulos		
		NTRK-fuusion negatiivinen	Kelvoton	Yhteensä
NTRK-fuusion positiivinen	114	16	1	131
NTRK-fuusion negatiivinen	4	273	6	283
Kelvottomat*	4	28	53	85
Yhteensä	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kelvottomat tulokset tulevat näytteen ja ajon tasolta.

[Taulukko 84](#) esitetään yhtäpitävyysanalyysit sekä ilman kelvottomia TSO Comprehensive (EU) -määritystuloksia että niiden kanssa. Ilman kelvottomia TSO Comprehensive (EU) -määritystuloksia PPA oli 96,6 % (114/118; 95 %:n CI: 91,5–99,1 %) ja NPA oli 94,5 % (273/289; 95 %:n CI: 91,2–96,8 %).

Taulukko 84 NTRK-tarkkuustutkimus: TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PPA ja NPA verrattuna ortogonaalisen menetelmän tulokseen NTRK-fuusioiden tunnistamiseksi

Yhtäpitävyyssmittaus	Pois lukien kelvottomat TSO Comprehensive (EU) -määritystulokset		Sisältää kelvottomat TSO Comprehensive (EU) -määritystulokset	
	Yhtäpitävyys, % (n/N)	95 %:n CI*	Yhtäpitävyys, % (n/N)	95 %:n CI*
PPA	96,6 (114/118)	91,5, 99,1	93,4 (114/122)	87,5, 97,1
NPA	94,5 (273/289)	91,2, 96,8	86,1 (273/317)	81,8, 89,7

* 95 %:n CI perustuen (eksaktiin) Clopper-Pearsonin menetelmään.

Kliininen vertaileva tutkimus NTRK1-, NTRK2- ja NTRK3-fuusion tunnistukselle

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kliininen kelpoisuus NTRK1-, NTRK2- tai NTRK3-fuusioiden tunnistamiseksi potilaissa, joilla on kiinteitä kasvaimia ja jotka voivat hyötyä larotrekinihoidosta, osoitettiin kliinisessä vertailevassa tutkimuksessa. Tutkimus suoritettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kliinisen tehokkuuden arvioimiseksi NTRK1-, NTRK2- tai NTRK3-fuusion positiivisten potilaiden tunnistamiseksi larotrekinihoitoa varten sekä yhtäpitävyyden arvioimiseksi TSO Comprehensive (EU) -määrityksen ja paikallisen testauksen (LT) menetelmien välillä (näitä käytetään NTRK-fuusion tilan määrittämiseksi larotrekinihoidon kliinisiä tutkimuksia varten).

LT-menetelmiin kuuluvat NGS, fluoresoiva in situ -hybridisaatio (FISH), polymeraasiketjureaktio (PCR) ja Nanostring-määritykset. NTRK-fuusioiden (ETV6 NTRK3) johdettiin potilaille, joilla on infantiili fibrosarkooma ja joilla oli FISH:in tunnistama dokumentoitu ETV6-translokaatio. Suurin osa 235 larotrekinihoidotutkimuspotilaista, joilla oli tunnettu NTRK-fuusiotila, oli testattu NGS-menetelmällä.

Tietojen eräpäivään, 15. heinäkuuta 2019, mennessä mukaan oli otettu 279 potilasta. 279 potilaasta 208 oli NTRK-fuusiopositiivisia. 208:sta positiivisesta potilaasta 164 muodosti larotrekinihoidon ePAS4:n.

Ensisijainen päätetapahtuma larotrekinihoidon tehokkuusanalyysille oli vasteen kokonaismäärä (ORR) itsenäisen arviointitoimikunnan (IRC) arvioinnin mukaan poolatussa tietojoukossa kolmesta kliinisestä tutkimuksesta. ORR arvioitiin sellaisten potilaiden osuuden perusteella, joilla oli varmistetun täydellisen vasteen paras kokonaisvaste tai varmistettu osittainen vaste RECIST-version 1.1 kriteerien perusteella. Larotrekinihoidon ePAS4:n ORR oli 72,6 % (95 %:n CI [65,1 %, 79,2 %]), ja siihen sisältyi 16:n eri kasvaintyyppin potilaita.

Näytteen laskenta

Näytesarja edusti laajaa valikoimaa kasvaintyyppistä ja pediatristen ja aikuispotilaiden näytteitä.

Larotrekinihoidotutkimuksiin oli kirjattu 279 potilasta 15. heinäkuuta 2019 mennessä. Näistä 235 potilaalla oli tunnettu NTRK-fuusiotila LT-menetelmällä määriteltynä: 208 oli positiivista ja 27 negatiivista. 44 potilaan kohdalla NTRK-fuusiotila oli tuntematon, sillä testausta ei edellytetty potilaan kelpoisuutta varten annoksen lisäsvaiheissa NCT02122913- ja SCOUT NCT02637687 -tutkimuksissa. TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kliinisessä vertailututkimuksissa tähän tutkimukseen kelpuutettiin näytteet

larotrektrinibitutumuspotilailta, jotka oli rekisteröity 15. heinäkuuta 2019 mennessä ja joilla oli tunnettu NTRK-fuusion tila (208 positiivista ja 27 negatiivista potilasta), sekä lisänäytteet, jotka oli määritetty NTRK-fuusion osalta negatiivisiksi edustavilla LT-menetelmillä.

208 positiivisesta larotrektrinibitutumusnäytteestä 154:llä oli käytettävissä oleva näyte TSO Comprehensive (EU) -määritystestausta varten. Näistä 138:lla oli kelvolliset tulokset. Kelvottomia näytteitä oli viisitoista, koska näytteen sekvensoinnin laatumittarit hylkäsivät ne, ja yhtä näytettä ei testattu protokollapoikkeaman vuoksi. 27 negatiivisesta larotrektrinibitutumusnäytteestä 24:llä oli näyte saatavilla testaukseen. Näistä 22:lla oli kelvolliset TSO Comprehensive (EU) -määrittelyn tulokset. Kaksi näytettä oli kelvottomia, sillä ne eivät läpäisseet näytteen sekvensoinnin laatumittareita.

Lisänäytteet seulottiin käyttämällä toista edustavista LT-menetelmistä. Yli 350 näytettä hankittiin ja tutkittiin kasvainsisällön osalta. Lisänäytteistä, jotka vastasivat näytevaatimuksia, 266 uutettiin onnistuneesti ja vahvistettiin NTRK-fuusion osalta negatiivisiksi edustavalla LT-menetelmällä. Näistä 260 oli saatavilla TSO Comprehensive (EU) -määritystestaukseen ja 222:lla oli kelvollisia tuloksia. Oli 38 näytettä, jotka olivat kelvottomia, näytteen sekvensointimittareiden (n. = 25) tai ajon sekvensoinnin (n. = 13) epäonnistumisen vuoksi. NTRK-fuusion negatiiviseen kokonaissarjaan sisältyy 222 lisänäytettä ja 22 larotrektrinibitutumusnäytettä.

Yhtäpitävyystulokset

Yhteensä 437 näytettä testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä. 208:lla NTRK-fuusiopositiivisesta potilaasta 153:lla oli käytettävissä olevia näytteitä ja ne testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä, mikä tuotti 138 kelvollista tulosta ja 15 kelvotonta tulosta.

[Taulukko 85](#) esittää TSO Comprehensive (EU) -tulosten yhtäpitävyyden LT-menetelmien tuloksiin nähden kelvottomien TSO Comprehensive (EU) -tulosten kanssa ja ilman niitä.

Taulukko 85 NTRK:n kliininen vertaileva tutkimus: TSO Comprehensive (EU) -analyysin ja LT-menetelmien välinen yhtäpitävyys NTRK-fuusioiden havaitsemiselle

Yhtäpitävyyssmittaus	Pois lukien TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kelvottomat tulokset		Sisältäen TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kelvottomat tulokset	
	Yhtäpitävyys, % (n/N)	95 %:n CI*	Yhtäpitävyys, % (n/N)	95 %:n CI*
PPA	89,1 (123/138)	82,7, 93,8	80,4 (123/153)	73,2, 86,4
NPA	96,3 (235/244)	93,1, 98,3	82,7 (235/284)	77,8, 87,0
OPA	93,7 (358/382)	90,8, 95,9	81,9 (358/437)	78,0, 85,4

* Kaksipuoliset 95 %:n CI:t laskettiin (eksaktilla) Clopper-Pearsonin menetelmällä.

Herkkyysanalyysi suhteessa puuttuviin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tuloksiin osoitti yhtäpitävyyssmittausanalyysin vakauden. Puuttuvat TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tulokset LT:n NTRK-fuusion positiivisille potilaille (n = 70) laskettiin logistisen regression mallilla. [Taulukko 86](#) esittää yhtäpitävyysestimatit yhdessä laskennallisten arvojen kanssa.

Taulukko 86 NTRK:n kliininen vertaileva tutkimus: Yhtäpitävyys TSO Comprehensive (EU) -määrityksen ja LT-menetelmien välillä NTRK-fuusioiden tunnistamisen osalta, mukaan lukien imputoidut arvot LT-positiivisille potilaille, joiden TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tulokset puuttuvat

Yhtäpitävyyssmittaus	Yhtäpitävyys, %	95 %:n CI*
PPA	85,2	(78,6, 91,7)
NPA	96,3	(93,9, 98,7)
OPA	91,2	(87,9, 94,5)

Puuttuvia TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tuloksia LT-fuusion negatiivisille potilaille ei laskettu.

* Kaksipuoliset 95 %:n CI:t laskettiin moni-imputoinnin Boot-menetelmän perusteella. Moni-imputoinnin Boot-menetelmä on bootstrap-vaihe, joka on sisäkkäinen moni-imputoinnissa (Schomaker ja Heumann 2018).

Taulukko 87 esittää yhtäpitävyydet TSO Comprehensive (EU) -määrityksen ja LT-menetelmien välillä menetelmätyypin mukaan (esim. RNA NGS, FISH).

Taulukko 87 NTRK:n kliininen vertaileva tutkimus: Yhtäpitävyys TSO Comprehensive (EU) -määrityksen ja LT-menetelmien välillä NTRK-fuusioiden havaitsemiselle LT-menetelmätyypin mukaan

LT-menetelmätyyppi	Yhtäpitävyyden mittari	Yhtäpitävyys, % (n/N)	95 %:n CI ¹
DNA NGS	PPA	84,2 (32/38)	(68,7, 94,0)
	NPA	88,9 (16/18)	(65,3, 98,6)
	OPA	85,7 (48/56)	(73,8, 93,6)
RNA NGS ²	PPA	91,5 (75/82)	(83,2, 96,5)
	NPA	96,9 (218/225)	(93,7, 98,7)
	OPA	95,4 (293/307)	(92,5, 97,5)
FISH	PPA	80,0 (8/10)	(44,4, 97,5)
	NPA	Ei laskettu (1/1)	Ei laskettu
	OPA	81,8 (9/11)	(48,2, 97,7)
PCR	PPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)
	NPA	Ei laskettu (0/0)	Ei laskettu
	OPA	100,0 (8/8)	(63,1, 100,0)

Ei laskettu: yhtäpitävyyden tilastotietoja ei laskettu alaryhmille, joiden näyteluku < 5.

¹ Kaksipuoliset 95 %:n CI:t laskettiin (eksaktilla) Clopper-Pearsonin menetelmällä.

² Sisältää NGS-menetelmät, joissa käytetään vain RNA:ta ja sekä DNA:ta että RNA:ta.

437 näytteestä, jotka testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä, 24:llä oli ei-vastaavia tuloksia LT:iden kanssa: 15 oli positiivisia LT:iden mukaan ja negatiivisia TSO Comprehensive (EU) -määrityksen mukaan ja 9 oli

negatiivisia LT:iden mukaan ja positiivisia TSO Comprehensive (EU) -määrityksen mukaan. 24 epäyteneväisistä näytteistä 8 testattiin DNA NGS LT -menetelmällä, 14 RNA NGS LT -menetelmällä ja 2 FISH:llä.

Validoitu itsenäinen NGS-menetelmä vahvisti TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tulokset 14:ssä 24 näytteestä, joilla oli epäyteneväiset tulokset. Jäljellä olevien 10 näytteen TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tulokset olivat epäyteneväisiä sekä LT:n että itsenäisen NGS-menetelmän kanssa.

Kliinisen tehokkuuden tulokset

ePAS4-kohortissa larotrektrinibin tehokkuus TSO Comprehensive (EU) -määrityksen positiivisessa, LT-positiivisessa väestössä (97 potilasta, ORR = 78,4 %, 95 %:n CI [68,8 %, 86,1 %]) vastasi larotrektrinibin tehokkuutta ePAS4-kokonaisväestössä (164 potilasta, ORR = 72,6 %, 95 %:n CI [65,1 %, 79,2 %]) (Taulukko 88). 97:stä TSO Comprehensive (EU) -määrityksen positiivisesta potilaasta ePAS4:ssa 28 (28,9 %) potilasta saavutti täydellisen vasteen / täydellisen kirurgisen vasteen ja 48 (49,5 %) potilasta saavutti osittaisen vasteen.

13:sta TSO Comprehensive (EU) -määrityksen negatiivisesta, LT-positiivisesta väestöstä, 1 (7,7 %) osoitti täydellistä vastetta ja 2 (15,4 %) osoitti osittaista vastetta larotrektrinibihoitoon.

Taulukko 88 NTRK:n kliininen vertaileva tutkimus: ORR LT-positiivisille potilaille LT:n mukaan ja TSO Comprehensive (EU) -tulokset ePAS4:ssä

		LT-fuusion positiivinen N = 164	TSO Comprehensive (EU) Positiivinen ja LT- positiivinen N = 97	TSO Comprehensive (EU) Negatiivinen ja LT- positiivinen N = 13
Paras kokonaisvaste, n (%)	Täydellinen vaste	31 (18,9)	22 (22,7)	1 (7,7)
	Täydellinen kirurginen vaste	8 (4,9)	6 (6,2)	0
	Osittainen vaste	80 (48,8)	48 (49,5)	2 (15,4)
	Stabiili sairaus	25 (15,2)	13 (13,4)	4 (30,8)
	Etenevä sairaus	13 (7,9)	6 (6,2)	5 (38,5)
	Ei voida arvioida	7 (4,3)	2 (2,1)	1 (7,7)
Kokonaisvasteen määrä	Potilaiden lukumäärä, n	164	97	13
	Potilaiden lukumäärä , joilla CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR % (95 %:n CI*)	72,6 (65,1, 72,9)	78,4 (68,8, 86,1)	23,1 (5,0, 53,8)

Lyhenteet: CR = täydellinen vaste, PR = osittainen vaste sCR = kirurginen täydellinen vaste.

* Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettiin (eksaktilla) Clopper-Pearsonin menetelmällä.
54 potilaalla on puuttuvat TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tulokset.

Tämän tutkimuksen tiedot tukevat TSO Comprehensive (EU) -määrityksen turvallisuutta ja tehokkuutta, kun sitä käytetään sellaisten potilaiden tunnistamiseen, joilla on kiinteitä kasvaimia NTRK-fuusioilla ja jotka saattavat soveltua larotrektiinibihoitoon.

Lähdeviitteet

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

Versiohistoria

Tarkistus	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirja nro 200007789 v08	Toukokuu 2025	<p>Poistettu viittaus ohjelmistoversioihin ja osanumeroihin.</p> <p>Päivitetyt menetelmän rajoitukset:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nekroottista kudosta koskevat tiedot. • MSI-kasvainsisältöä koskevat tiedot. <p>Päivitetty:</p> <ul style="list-style-type: none"> • NTC-alaviite, jotta se koskisi sekä minimi- että maksimikirjastoja. • Laite- ja materiaaliluettelon levysentrifugin määritykset ja pipetin mittavälit. • SPB:n ylimerkintälaskelma (1,05-kertoimen sijaan otettiin käyttöön kerroin 1,15) • MET exon 14 del -termi, joka korvattiin termillä MET-eksoni 14:n ohitus. <p>Lisätty:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SMB:tä koskeva huomautus (kohteiden 1 ja 2 sieppaaminen). • Sekvensoinnin valmistelun johdanto. • Ultrasonikaattoria koskevat lisätiedot. <p>Lisätyt tarkennukset ja suorituskykyominaisuuksia koskevien tulosten päivitykset:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Häiritsevät aineet. • Kasvainprofiloinnin ja näytteen validiteetin tarkkuus. • Havaitsemisraja (tutkimukset 1 ja 2). • Laboratorion sisäisen tarkkuuden tutkimus 1. • Uusittavuustutkimus 2. • Kirjaston stabiliteettia ja kirjaston säilytystä koskevat tiedot. • Tyhjän raja. <p>Sanamuotoja ja kieliopillisia rakenteita päivitettiin.</p>

Tarkistus	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanumero 200007789 v07	Tammikuu 2024	<ul style="list-style-type: none"> • Lisätty tietoja kohtaan Toimenpiteen rajoitukset: <ul style="list-style-type: none"> • Nekroottisen kudoksen ja kasvainsisällön näytevaatimukset MSI-korkea-parametrin ja somaattisten ajajamutaatioiden osalta • Hemoglobiinin mahdollisesti aiheuttama häiriö • RET-geenin ja fuusioitunnistuksen havaitsemisrajat geenin merkittyjen rajojen ulkopuolella. • Geenien deleetioita ei raportoida. • Päivitetty käytettäväksi TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager -ohjelmiston version 2.3.7 kanssa. • Lisätty tietoja tarvittavista mutta ei toimitetuista laitteista ja materiaaleista, mukaan lukien kaksi ultrasonikaattorin lisämääritystä. • Näytetiedot on päivitetty: <ul style="list-style-type: none"> • Nekroottisen kudoksen pitoisuus • Proteinaasi K:n ja hemoglobiinin vaikutukset • Objektilasille preparoitujen FFPE-näytteiden ja puhdistetun nukleiinihapon säilytys • Lisätty tietoja reagenssien käsittelyn, työnkulun ja ajon laadunvalvonnan vianmäärityksen parantamiseksi. • Lisätty konteksti ja selvennys suoritusominaisuuksiin: <ul style="list-style-type: none"> • Ristikontaminaatio • Nukleiinihapon uuttamispakkauksen arviointi • Häiritsevät aineet • Nukleiinihapon ja objektilasille preparoidun FFPE-näytteen stabiilius • NTRK, kliininen suorituskyky • Sanamuodot ja kieliopilliset rakenteet on päivitetty
Asiakirja nro 200007789 v06	Helmikuu 2023	<ul style="list-style-type: none"> • Rajoitukset-osion lisälauseet • Kielipäivitykset kielenhuoltoon, kielioppiin ja selkeyteen • Taulukoiden 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 korjaus • Ilmoitus saostumien esiintymisestä FSM-reagenssissa • Päivitetty PCR-laitteen ja kaukalon teknisiä tietoja väline- ja materiaaliluettelossa
Asiakirjanumero 200007789 v05	Syyskuu 2022	Päivitetty tutkimuksen 2 toistettavuustaulukot

Tarkistus	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirjanumero 200007789 v04	Kesäkuu 2022	<ul style="list-style-type: none">• Lisättiin TSO Comprehensive analysis module v2.3.5 -PN:t• Poistettiin TSO Comprehensive -analyysimoduuli v2.3.3 -PN:t• Päivitetty terminologia kohdassa Tyhjän kohdan raja
Asiakirjanumero 200007789 v03	Huhtikuu 2022	<ul style="list-style-type: none">• Lisättiin NTRK-fuusioihin liittyvät suorituskykyominaisuuksien tiedot• Lisättiin merkintä FOR EXPORT ONLY (VAIN VIENTIIN)• Päivitettiin käyttötarkoitukselauseke NTRK1-3 CDx -väitteen lisäämiseksi• Tuotekomponenttien tietoja laajennettiin sisältämään ohjelmistokomponenttien PN:t
Asiakirjanumero 200007789 v02	Helmikuu 2022	<ul style="list-style-type: none">• Korjattiin taulukon viitevirhe• Lisättiin rajoitus, joka liittyy ituradan ja somaattisiin variantteihin• Selkeytettiin kielellistä esitysasua geenin monistumisen havaitsemisesta
Asiakirjanumero 200007789 v01	Joulukuu 2021	<ul style="list-style-type: none">• Päivitettiin menetelmän rajoitukset• Selkeytettiin magneettisen jalustan ja PCR-laitteen teknisiä tietoja, jotka ovat laite- ja materiaaliluetteloissa
Asiakirjanumero 200007789 v00	Marraskuu 2021	Ensimmäinen julkaisu

Patentit ja tavaramerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illumina-yhtiön asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illumina-yhtiöltä ennakoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patenti-, tavaramerki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä asiakirjassa kuvattuja ohjeita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tässä kuvattujen tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI KAIKKIA TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA NOUDATETA TÄSMÄLLISESTI, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

© 2025 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot ovat verkkosivustolla www.illumina.com/company/legal.html.

Yhteystiedot



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE

IVD



Tuotteiden merkinnät

Katso kaikkien tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset verkko-osoitteesta support.illumina.com käyttämäsi pakkauksen välilehdeltä *Documentation* (Dokumentaatio).