

# TruSight Oncology Comprehensive (UE)

## Folheto informativo

PARA UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO. APENAS PARA EXPORTAÇÃO.

## Utilização prevista

O TruSight Oncology Comprehensive (UE) é um teste de diagnóstico *in vitro*, que utiliza sequenciação de nova geração direcionada para detetar variantes em 517 genes, utilizando ácidos nucleicos extraídos de amostras de tecido tumoral fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) de doentes com cancro, com neoplasias malignas sólidas, utilizando o instrumento Illumina® NextSeq™ 550Dx. O teste pode ser utilizado para detetar variantes de nucleótido único, variantes de nucleótidos múltiplos, inserções, deleções e amplificações de genes do ADN e fusões genéticas e variantes de união exão-intrão do ARN. O teste também relata uma pontuação de Carga Tumoral Mutacional (TMB) e estado de Instabilidade de Microssatélites (MSI).

O teste destina-se a ser um diagnóstico complementar para identificar doentes com cancro, para tratamento com a terapêutica orientada listada na [Tabela 1](#), de acordo com a rotulagem aprovada do produto terapêutico. Além disso, o teste destina-se a fornecer informações de perfil tumoral, para utilização por profissionais de cuidados de saúde qualificados, de acordo com as diretrizes profissionais, e não é conclusivo ou prescritivo para utilização rotulada de qualquer produto terapêutico específico.

Tabela 1 Indicações de diagnósticos complementares

Tipo de tumor	Biomarcadores	Terapêutica orientada
Tumores sólidos	NTRK1, NTRK2 e NTRK3 Fusões genéticas	VITRAKVI® (larotrectinib)

# Resumo e explicação do ensaio

## Descrição clínica

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo e pode ter origem em qualquer tecido.<sup>1</sup> A análise da base genética de um tumor é importante para identificar doentes que possam beneficiar de terapêuticas orientadas e para desenvolver novos métodos de tratamento. Vários genes têm sido implicados na causalidade ou progressão do tumor e muitos tumores têm uma multiplicidade de variantes, que afetam estes genes e as suas funções. Estas variantes podem incluir mutações genéticas, tais como variantes de nucleótido único (SNV), variantes de nucleótidos múltiplos (MNV), inserções ou deleções, amplificações de genes, fusões genéticas e variantes de união exão-intrão. Outra consequência das mutações genéticas ligadas a tumores é a apresentação de neoantígenos, que desencadeiam respostas imunitárias específicas do tumor. O estado mutacional de um tumor pode ser representado por TMB e MSI, que são assinaturas genómicas que estão associadas à apresentação de neoantígenos tumorais.

O TruSight Oncology Comprehensive é uma teste de perfil genómico abrangente (CGP) de sequenciação de nova geração (NGS) que avalia amplamente as variantes genómicas num grande painel de genes relacionados com o cancro listados na [Tabela 2](#). O ensaio deteta pequenas variantes em 517 genes, mais amplificações de genes, fusões e variantes de união exão-intrão, conforme indicado na [Tabela 2](#). O ensaio fornece cobertura de sequência de codificação para todos os genes, exceto TERT, onde apenas a região promotora é coberta, e avalia a pontuação de TMB e o estado de MSI. Estes alvos do ensaio incluem conteúdo citado por organizações profissionais, como a Sociedade Europeia de Oncologia Médica (ESMO) e outras diretrizes importantes dos EUA.<sup>2</sup> As publicações de consórcios independentes e a investigação farmacêutica em fase avançada também influenciaram a conceção do ensaio TSO Comprehensive.

Para obter uma lista de regiões que estão excluídas da identificação de variantes, consulte a *Lista abrangente de bloqueio TruSight Oncology Comprehensive (documento n.º 200009524)* disponível no site de apoio Illumina. A lista de bloqueio é referida como lista negra nalguns ficheiros.

Na [Tabela 2](#), são identificadas quatro categorias de tipo de variante: pequena variante de ADN (S), amplificação genética (A), fusão (F) e variantes de união exão-intrão (Sp). Variantes pequenas de ADN incluem SNV, MNV e inserções e deleções.

Tabela 2 TSO Comprehensive (UE) Painel de genes do ensaio

N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante
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

N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S

N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S

N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante
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
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

N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLLT3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRF1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
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

N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante	N.º	Entrez ID	Gene	Tipo de variante
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFH3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
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	ND	ND	ND	ND
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	ND	ND	ND	ND
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	ND	ND	ND	ND
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	ND	ND	ND	ND
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	ND	ND	ND	ND
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	ND	ND	ND	ND
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	ND	ND	ND	ND
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	ND	ND	ND	ND

# Princípios do procedimento

O ensaio TSO Comprehensive (UE) é um teste distribuído que é realizado utilizando ácido nucleico extraído como material de entrada. O ADN e/ou ARN extraídos do tecido FFPE são utilizados para preparar bancos, que são depois enriquecidos para genes-relacionados com o cancro e sequenciados no Instrumento NextSeq 550Dx.

O ensaio TSO Comprehensive (UE) envolve os seguintes processos.

- **Preparação e enriquecimento do banco** — Para ARN, o total de 40 ng é convertido em ADN complementar de cadeia dupla (ADNc). No caso do ADN genómico (gDNA), 40 ng de gDNA são cisalhados em pequenos fragmentos. Os adaptadores universais para sequenciação são ligados aos fragmentos de ADNc e gDNA. As sequências de índice P5 e P7 são incorporadas em cada banco, para permitir a captura de fragmentos do banco, na superfície da célula de fluxo, durante a sequenciação. Os índices incluem uma sequência única para identificar cada amostra individual e, no caso de bancos de amostras de ADN genómico, moléculas individuais com a utilização de identificadores moleculares únicos (UMI). Os bancos são então enriquecidos para os genes específicos de interesse utilizando um método baseado em captura. As sequências de sondas biotiniladas, que abrangem as regiões de interesse visado do gene do ensaio, são hibridadas com os bancos. As sondas e bancos visados hibridados são isolados de bancos não visados por captura com partículas magnéticas de estreptavidina. Os bancos enriquecidos visados são lavados e amplificados. A quantidade de cada banco enriquecido é então normalizada utilizando um método baseado em esférulas, para garantir uma representação igual nos bancos agrupados para sequenciação.
- **Sequenciação e análise primária** — Os bancos normalizados e enriquecidos são agrupados numa célula de fluxo e, em seguida, sequenciadas utilizando a sequenciação por síntese (SBS) química no NextSeq 550Dx. A química SBS utiliza um método reversível de terminador para detetar bases únicas de desoxirribonucleótido trifosfatado (dNTP) com marcação fluorescente à medida que são incorporadas em cadeias crescentes de ADN. Durante cada ciclo de sequenciação, é adicionado um único dNTP à cadeia de ácidos nucleicos. O rótulo dNTP serve como terminador para polimerização. Após cada incorporação de dNTP, o corante fluorescente é espelhado para identificar a base e, em seguida, clivado para permitir a incorporação do nucleótido seguinte. Estão presentes quatro dNTP reversíveis ligados ao terminador (A, G, T e C) como moléculas únicas e separadas. Como resultado, a concorrência natural minimiza o preconceito de incorporação. Durante a análise primária, as identificações de base são feitas diretamente a partir de medições de intensidade de sinal durante cada ciclo de sequenciação, resultando em sequenciação de base a base. É atribuída uma pontuação de qualidade a cada identificação de base.
- **Análise secundária** — O Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) reside no instrumento NextSeq 550Dx como parte do software Local Run Manager (LRM), para facilitar a configuração do ensaio TSO Comprehensive (UE) e para realizar a análise secundária dos resultados de sequenciação. A análise secundária inclui a validação do processamento do ensaio e do controlo de qualidade, seguidos pela desmultiplexagem, produção de ficheiros FASTQ, alinhamento e identificação de variantes. A desmultiplexagem separa os dados dos bancos agrupados, com base nos índices de sequência únicos que foram adicionados durante o procedimento de preparação do banco. São gerados ficheiros



intermédios FASTQ, que contêm as leituras de sequenciação para cada amostra e as pontuações de qualidade, excluindo leituras de quaisquer agrupamentos que não passaram no filtro. As leituras de sequenciação são então alinhadas com um genoma de referência, para identificar uma relação entre as sequências e é atribuída uma pontuação com base em regiões de semelhança. As leituras alinhadas são escritas em ficheiros no formato BAM. O software de ensaio utiliza algoritmos separados para bancos gerados a partir de amostras de ADN e/ou ARN para identificação de variantes pequenas de ADN, amplificações de genes, TMB e MSI para amostras de ADN e fusões e variantes de união exão-intrão para amostras de ARN. As saídas múltiplas são geradas pelo módulo de software de análise, incluindo indicadores de sequenciação e ficheiros de formato de identificação de variantes (VCF). Os ficheiros VCF contêm informações sobre as variantes encontradas em posições específicas, num genoma de referência. São gerados indicadores de sequenciação e ficheiros de saída individuais para cada amostra. Consulte o Manual do fluxo de trabalho do módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (documento n.º 200008661) para obter detalhes sobre a análise secundária e terciária.

- **Análise terciária** — A análise terciária, realizada pelo Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE), consiste em cálculos de TMB e MSI, identificação de diagnóstico complementar, perfil tumoral de variantes em dois níveis de significância clínica usando uma Base de Conhecimento (KB) e o tipo de tecido, e produção de relatórios de resultados. O perfil tumoral também pode ser referido como perfil genómico abrangente. Os resultados da variante interpretada, bem como os resultados dos biomarcadores TMB e MSI, são resumidos no relatório de resultados do TSO Comprehensive (UE).

## Limitações do procedimento

### Para utilização em diagnóstico *in vitro*, apenas.

- Apenas para utilização com receita médica. O teste tem de ser utilizado de acordo com os regulamentos laboratoriais clínicos.
- Os resultados genómicos listados na [Tabela 2](#) da utilização prevista não são prescritivos nem conclusivos, para utilização rotulada de qualquer produto terapêutico específico.
- Para as variantes listadas no relatório de resultados do TSO Comprehensive (UE) em Conclusões genómicas com potencial significância clínica ou Conclusões genómicas com potencial significância clínica, a validação clínica não foi realizada.
- As decisões sobre os cuidados prestados e tratamento do doente devem basear-se no parecer médico independente do médico assistente, tendo em consideração todas as informações aplicáveis relativas à sua doença, tais como os antecedentes familiares e do doente, exames físicos, informações de outros testes de diagnóstico e preferências do doente, de acordo com o nível de cuidados numa determinada comunidade.
- A qualidade da amostra FFPE é altamente variável. As amostras, que não foram submetidas a procedimentos normalizados de fixação, podem não gerar ácidos nucleicos extraídos que cumpram os requisitos de controlo de qualidade do ensaio ([Controlo de qualidade na página 83](#)). Os blocos FFPE que foram armazenados por mais de cinco anos demonstraram menor validade.

- O desempenho de TSO Comprehensive (UE), em amostras obtidas de doentes submetidos a transplante de órgãos ou tecidos, não foi avaliado.
- Em genomas altamente reorganizados com deleções e perda de heterozigosidade, o software TSO Comprehensive (UE) pode classificar erroneamente uma amostra de ADN como contaminada (CONTAMINATION\_SCORE > 3106 e valor de p > 0,049).
- Um resultado negativo não exclui a presença de uma mutação abaixo dos limites de deteção (LoD) do ensaio.
- A sensibilidade para deteção de variantes pequenas de ADN pode ser afetada por:
  - Contexto genómico de baixa complexidade
  - Aumentar o comprimento da variante
- As pontuações de TMB podem ser imprecisas nos seguintes contextos:
  - À medida que o conteúdo tumoral atinge níveis onde as frequências de alelos de variantes germinativas e somáticas (VAF) convergem.
  - Em populações não bem representadas em bases de dados públicas.
- A sensibilidade para deteção de fusões pode ser afetada:
  - Por baixa complexidade do banco, resultando em leituras de apoio reduzidas devido a desvios no fluxo de trabalho do ensaio (por exemplo, siga os passos de mistura em [ARN desnaturado e hibridado na página 46](#)).
  - Quando um único gene abrange ambos os pontos de corte.
  - Nos casos em que vários pontos de corte de fusões estão muito próximos uns dos outros com um ou vários parceiros, os vários pontos de corte e parceiros podem ser comunicados como um único ponto de corte e parceiro.
  - Por tamanhos médios de insertos pequenos, é necessário um tamanho médio de inserto mínimo de 80 bp, mas a sensibilidade diminui no intervalo de 80 – 100 bp.
  - Por baixa complexidade de sequência ou contexto genómico homólogo em torno dos pontos de corte de fusão.
- A resolução dos genes envolvidos numa fusão pode ser afetada, quando ocorrem pontos de corte de fusão em regiões genómicas que contêm genes sobrepostos. O ensaio irá comunicar todos os genes, delimitados por ponto e vírgula, se vários genes estiverem sobrepostos num ponto de corte.
- A cobertura inconsistente na região do promotor TERT pode resultar em Sem resultado devido à baixa profundidade.
- A anotação ou erros KB pode causar um resultado falso positivo ou falso negativo, incluindo listar uma variante no nível errado (entre Conclusões genómicas com potencial significância clínica ou Conclusões genómicas com potencial significância clínica) ou as informações de anotação no relatório podem estar incorretas. A possibilidade de erro existe a partir de três fontes:

- Anotação de variante de TSO Comprehensive (UE). Existe uma taxa de erro de aproximadamente 0,0027%, com base numa análise de 2.448.350 variantes do COSMIC v92, portanto, existe uma baixa possibilidade de erro.
- Erro KB devido ao processo de seleção ou estratificação.
- A relevância do conteúdo de KB muda ao longo do tempo. O relatório irá refletir o conhecimento na altura em que a versão KB foi selecionada.
- As variantes comunicadas nos resultados CDx não são afetadas por erros de anotação ou KB.
- O TSO Comprehensive (UE) foi concebido para comunicar variantes somáticas ao comunicar variantes com evidências de significância clínica ou variantes com potencial significância clínica. Como um teste apenas tumoral, é possível comunicar variantes de linhagem germinativa (herdada), mas não intencional. O TSO Comprehensive (UE) usa uma KB para comunicar variantes, sem anotar explicitamente se são de origem germinativa ou somática.
- A KB inclui apenas associações terapêuticas, diagnósticas e prognósticas, que são relevantes para variantes presentes numa neoplasia maligna sólida estabelecida. As associações de suscetibilidade ou risco de cancro não estão incluídas na KB.

## Componentes do produto

O teste TruSight Oncology Comprehensive (UE) consiste nos seguintes componentes:

- Kit TruSight Oncology Comprehensive (UE) ( catálogo Illumina n.º 20063092): O kit inclui reagentes com volume suficiente para produzir 24 bancos de ADN e 24 bancos de ARN com mecanismos de controlo, que incluem amostras de doentes e mecanismos de controlo. Mecanismos de controlo vendidos separadamente (consulte [Reagentes necessários, não fornecidos na página 19](#)).
- Base de conhecimentos: Atualizado regularmente e disponível para descarregar no portal Illumina Lighthouse.
- Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (Catálogo Illumina n.º 20051843\*), que inclui os seguintes componentes e suporta o perfil tumoral e NTRK:
  - Claims Packages TSO Comprehensive (UE) v2.1.0 (PN 20079589)
  - TSO Comprehensive (UE) v2.3.6 Software Suite (PN 20079588)
  - TSO Comprehensive (UE) v2.3.6 USB Kit (PN 20079591)
- Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (Catálogo Illumina n.º 20051843\*), que inclui os seguintes componentes e suporta o perfil tumoral e NTRK:
  - Claims Packages TSO Comprehensive (UE) v2.0.0 (PN 20051760)
  - TSO Comprehensive (UE) v2.3.5 Software Suite (PN 20075244)
  - TSO Comprehensive (UE) v2.3.5 USB Kit (PN 20075239)

\* Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE): Um representante da Assistência Técnica da Illumina instala a versão adequada do Módulo de análise do TSO Comprehensive (UE) no Local Run Manager Instrumento NextSeq 550Dx. Consulte [Tabela 3](#) para a versão de software do

módulo de análise e manual do fluxo de trabalho.

Tabela 3 Manual do fluxo de trabalho para a versão completa do software do módulo de análise TSO

<b>Manual do fluxo de trabalho</b>	<b>Tecido</b>	<b>Versão completa do software TSO</b>
200008661	FFPE	v2.3.5 ou v2.3.6

# Reagentes

## Reagentes fornecidos

Os seguintes reagentes são fornecidos com o kit do TSO Comprehensive (UE).

### Preparação de banco de ARN no TruSight Oncology Comp, PN 20031127

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Solução aquosa tamponada contendo sais e nucleótidos	-25 °C a -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Solução aquosa tamponada contendo sais, polimerase de ADN, RNase H e nucleótidos	-25 °C a -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Solução aquosa tamponada contendo sais e hexâmeros aleatórios	-25 °C a -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Solução aquosa tamponada contendo transcriptase reversa	-25 °C a -15 °C

### Preparação de banco (Congelado) no TruSight Oncology Comp, PN 20031118

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Solução aquosa tamponada contendo polimerases de ADN T4 e polinucleótido quinase	-25 °C a -15 °C

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Solução aquosa tamponada contendo sais e nucleótidos	-25 °C a -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Solução aquosa tamponada contendo sais	-25 °C a -15 °C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Solução aquosa tamponada contendo ligase	-25 °C a -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Solução aquosa tamponada contendo oligonucleótidos de sequenciação universal	-25 °C a -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Solução aquosa tamponada contendo oligonucleótidos de sequenciação universal	-25 °C a -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Solução aquosa tamponada contendo sais	-25 °C a -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Solução aquosa tamponada contendo polimerase de ADN e nucleótidos	-25 °C a -15 °C

### Preparação de banco (Refrigerado) no TruSight Oncology Comp, PN 20031119

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solução aquosa tamponada contendo sais	2 °C a 8 °C

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Solução aquosa contendo esférulas magnéticas	2 °C a 8 °C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Solução Tris EDTA	2 °C a 8 °C

## Primers de indexação UP TruSight Oncology Comp, PN 20031120

Substâncias ativas: Solução aquosa tamponada contendo primers de oligonucleótidos com codificação de barras individual.

**Nota** Utilize primers de indexação únicos (UPxx) para amostras de ARN ou ADN.

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

## Primers de indexação CP TruSight Oncology Comp, PN 20031126

Substâncias ativas: Solução aquosa tamponada contendo primers de oligonucleótidos com codificação de barras individual.



### ATENÇÃO

Utilize primers de indexação combinatórios (CPxx) apenas para amostras de ADN (fluxo de trabalho FFPE).

Primers de indexação	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Índice i7	Sequência	Índice i5	Sequência	Temperatura de armazenamento
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25 °C a -15 °C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25 °C a -15 °C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25 °C a -15 °C



Primers de indexação	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Índice i7	Sequência	Índice i5	Sequência	Temperatura de armazenamento
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25 °C a -15 °C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25 °C a -15 °C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25 °C a -15 °C
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25 °C a -15 °C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25 °C a -15 °C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25 °C a -15 °C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25 °C a -15 °C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25 °C a -15 °C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25 °C a -15 °C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25 °C a -15 °C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25 °C a -15 °C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25 °C a -15 °C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25 °C a -15 °C

### Enriquecimento (Refrigerado) TruSight Oncology Comp, PN 20031123

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Solução aquosa tamponada contendo formamida e sais	2 °C a 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Solução aquosa tamponada contendo sais e esférulas paramagnéticas de fase sólida revestidas com covalência com estreptavidina	2 °C a 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Solução de hidróxido de sódio	2 °C a 8 °C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Solução aquosa tamponada	2 °C a 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Solução aquosa tamponada contendo esférulas paramagnéticas de fase sólida	2 °C a 8 °C

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Solução aquosa tamponada contendo sais, 2-mercaptoetanol e formamida	2 °C a 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Solução aquosa tamponada contendo sais	2 °C a 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Solução aquosa tamponada contendo sais	2 °C a 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Solução aquosa contendo esférulas magnéticas	2 °C a 8 °C

### Enriquecimento (Congelado) TruSight Oncology Comp, PN 20031121

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Solução aquosa tamponada contendo oligonucleótidos	-25 °C a -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Solução aquosa tamponada contendo sais	-25 °C a -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Solução aquosa tamponada contendo detergente	-25 °C a -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Solução aquosa tamponada contendo polimerase de ADN e nucleótidos	-25 °C a -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Solução aquosa tamponada contendo primers P5 e P7	-25 °C a -15 °C

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Solução aquosa tamponada contendo sais, mercaptoetanol-2 e formamida	-25 °C a -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 or PhiX)	20031492	1	10 µl	Solução aquosa tamponada contendo ADN genómico PhiX	-25 °C a -15 °C

### Conjunto de conteúdos TruSight Oncology Comp, PN 20031122

Reagente	Ref. <sup>a</sup>	Quantidade	Volume	Substâncias ativas	Temperatura de armazenamento
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Pool de sondas para oligonucleótidos	-25 °C a -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Pool de sondas para oligonucleótidos	-25 °C a -15 °C

## Reagentes necessários, não fornecidos

### Reagentes de pré-amplificação

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents — Consulte [Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28](#), para obter os requisitos de reagentes.
- DNA and RNA Quantification Reagents — Consulte [Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28](#), para obter os requisitos dos reagentes.
- TruSight Oncology DNA Control (catálogo Illumina n.º 20065041)
- TruSight Oncology DNA Control (catálogo Illumina n.º 20065042)
- Ethanol 100% (prova 200), grau biológico molecular
- RNase/DNase-free water

### Reagentes pós-amplificação

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (catálogo Illumina n.º 20028871)
  - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 ciclos)

- NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
- NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- Ethanol 100% (prova 200), grau biológico molecular
- RNase/DNase-free water

## Conservação e manuseamento de reagentes

- As seguintes caixas de reagentes são fornecidas congeladas. Conservar entre -25 °C e -15 °C.

Caixa	Ref. <sup>a</sup>	Para área de laboratório de
preparação de banco de ARN no TruSight Oncology Comp	20031127	Pré-amplificação
Preparação de banco (Congelado) no TruSight Oncology Comp	20031118	Pré-amplificação
Primers de indexação UP TruSight Oncology Comp	20031120	Pré-amplificação
Primers de indexação CP TruSight Oncology Comp	20031126	Pré-amplificação
Enriquecimento (Congelado) TruSight Oncology Comp	20031121	Pós-amplificação
Conjunto de conteúdos TruSight Oncology Comp	20031122	Pós-amplificação



### ATENÇÃO

Não armazene os reagentes numa unidade de armazenamento sem gelo ou em compartimentos de porta do frigorífico.

- As seguintes caixas de reagentes são enviadas em pacotes de gel para manter entre 0 °C e 10 °C. Conservar entre 2 °C e 8 °C.

Caixa	Ref. <sup>a</sup>	Para área de laboratório de
Preparação de banco (Refrigerado) no TruSight Oncology Comp	20031119	Pré-amplificação
Enriquecimento (Refrigerado) TruSight Oncology Comp	20031123	Pós-amplificação



### ATENÇÃO

Não congele reagentes que contenham esférulas (LNB1, SPB e SMB).

- As alterações ao aspeto físico dos reagentes pode indicar a deterioração dos materiais. Se ocorrerem alterações no aspeto físico (por exemplo, alterações na cor ou turvação do reagente), não utilize os reagentes.
- A estabilidade do ensaio TSO Comprehensive (UE) foi avaliada e o desempenho demonstrado para até quatro utilizações do kit. Os reagentes mantêm-se estáveis até à data de validade especificada nas etiquetas da caixa, quando armazenados nas temperaturas indicadas.

## Equipamento e materiais

### Equipamento e materiais necessários, mas não fornecidos

#### Equipamento e materiais pré-amplificação

Equipamento	Fornecedor
Ultrassonicador com acessórios associados Consulte <a href="#">Otimização de ultrassonicadores para fragmentos de ADN na página 26</a> .	Fornecedor geral do laboratório
Termociclador com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tampa aquecida capaz de ser ajustada para 30 °C e 100 °C (ou desligada se não for capaz de atingir os 30 °C)</li> <li>• Intervalo de temperatura entre 4 °C e 99 °C</li> <li>• ± 0,25 °C de precisão de temperatura</li> <li>• Compatível com placas de PCR de 96 poços, 0,2 ml (polipropileno)</li> <li>• Consulte <a href="#">Taxa de rampa do termociclador na página 27</a></li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Agitador tipo vórtex	Fornecedor geral do laboratório
Incubadora (2) de microamostras com inserção de placas (2) MIDI de 96 poços	Fornecedor geral do laboratório
Microcentrifugador	Fornecedor geral do laboratório
Centrifugue (centrifugadora de placa) com as seguintes capacidades: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugação de microplacas de 96 poços</li> <li>• Capacidade de 280 × g</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Agitador de placas com as seguintes capacidades: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Órbita de 2 mm</li> <li>• Pode agitar a 1200 rpm e a 1800 rpm</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Selante de extremidades ou rolo compressor	Fornecedor geral do laboratório
Suporte magnético com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concebido para precipitação/separação de esférulas paramagnéticas</li> <li>• Ímanes na parte lateral do suporte, não na parte inferior</li> <li>• Para placas MIDI de 96 poços</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório

Equipamento	Fornecedor
Pipetas de precisão <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetas de canal único ou multicanal de 20 µl</li> <li>• Pipetas de canal único ou multicanal de 200 µl</li> <li>• Pipetas de canal único ou multicanal de 1000 µl</li> </ul> Que cumpram os seguintes requisitos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Calibrado regularmente, com uma precisão de 5%.</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Apoio às pipetas	Fornecedor geral do laboratório
Pipetas serológicas de 10 ml	Fornecedor geral do laboratório
Selos autocolantes para placas de 96 poços com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Poliéster óticamente transparente e destacável</li> <li>• Adequado para placas PCR com saia ou semi-saia</li> <li>• Adesivo forte que resista a múltiplas mudanças de temperatura de -40 °C a 110 °C</li> <li>• Isento de RNase/DNase</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Tubos de microcentrifugação de 1,7 ml, sem nuclease	Fornecedor geral do laboratório
Reservatórios de reagentes sem nuclease (PVC, descartável por calha, 50 ml) (ou equivalente)	Fornecedor geral do laboratório
Tubos cónicos de 15 ml	Fornecedor geral do laboratório
Tubos cónicos de 50 ml	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de pipeta resistentes a aerossóis de 20 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de pipeta resistentes a aerossóis de 200 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de pipeta resistentes a aerossóis de 1000 µl	Fornecedor geral do laboratório
Placas de armazenamento de 96 poços, 0,8 ml (placas MIDI)	Fisher Scientific, ref.ª n.º AB-0859 ou equivalente
Placas PCR de 96 poços, 0,2 ml (polipropileno)	Fornecedor geral do laboratório

## Equipamento e materiais pós-amplificação

Equipamento	Fornecedor
NextSeq 550Dx Instrumento	illumina, catálogo n.º 20005715
Centrifugue (centrifugadora de placa) com as seguintes capacidades: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrifugação de microplacas de 96 poços</li> <li>• Capacidade de 280 × g</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Termociclador com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tampa aquecida (100 °C)</li> <li>• Intervalo de temperatura entre 4 °C e 99 °C</li> <li>• ± 0,25 °C de precisão de temperatura</li> <li>• Compatível com placas de PCR de 96 poços, 0,2 ml (polipropileno)</li> <li>• Consulte <a href="#">Taxa de rampa do termociclador na página 27</a></li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Agitador tipo vórtex	Fornecedor geral do laboratório
Incubadora de microamostras com inserção de placas MIDI de 96 poços	Fornecedor geral do laboratório
Bloco de aquecimento seco com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Intervalo de temperatura entre 25 °C e 99 °C</li> <li>• ± 5 °C de precisão de temperatura</li> <li>• Certifique-se de que os tubos da microcentrifugadora são compatíveis com o bloco de aquecimento</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Agitador de placas com as seguintes capacidades: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Órbita de 2 mm</li> <li>• Pode agitar a 1200 rpm e a 1800 rpm</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Microcentrifugador	Fornecedor geral do laboratório
Selante de extremidades ou rolo compressor	Fornecedor geral do laboratório
Suporte magnético com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concebido para precipitação/separação de esférulas paramagnéticas</li> <li>• Ímanes na parte lateral do suporte, não na parte inferior</li> <li>• Para placas MIDI de 96 poços</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório



Equipamento	Fornecedor
Pipetas de precisão <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetas de canal único ou multicanal de 20 µl</li> <li>• Pipetas de canal único ou multicanal de 200 µl</li> <li>• Pipetas de canal único ou multicanal de 1000 µl</li> </ul> Que cumpram os seguintes requisitos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Calibrado regularmente, com uma precisão de 5%.</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Apoio às pipetas	Fornecedor geral do laboratório
Pipetas serológicas de 10 ml	Fornecedor geral do laboratório
Selos autocolantes para placas de 96 poços com as seguintes especificações: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Poliéster óticamente transparente e destacável</li> <li>• Adequado para placas PCR com saia ou semi-saia</li> <li>• Adesivo forte que resista a múltiplas mudanças de temperatura de -40 °C a 110 °C</li> <li>• Isento de RNase/DNase</li> </ul>	Fornecedor geral do laboratório
Tubos de microcentrifugação, sem nuclease	Fornecedor geral do laboratório
Reservatórios de reagentes sem nuclease (PVC, descartável por calha, 50 ml) (ou equivalente)	Fornecedor geral do laboratório
Tubos cónicos de 15 ml	Fornecedor geral do laboratório
Tubos cónicos de 50 ml	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de pipeta resistentes a aerossóis de 20 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de pipeta resistentes a aerossóis de 200 µl	Fornecedor geral do laboratório
Pontas de pipeta resistentes a aerossóis de 1000 µl	Fornecedor geral do laboratório
Placas de armazenamento de 96 poços, 0,8 ml (placas MIDI)	Fisher Scientific, ref.ª n.º AB-0859 ou equivalente
Placas PCR de 96 poços, 0,2 ml (polipropileno)	Fornecedor geral do laboratório

## Otimização de ultrassonicadores para fragmentos de ADN

A fragmentação ou cisalhamento de ADN influencia o desempenho do ensaio determinando a distribuição do tamanho do fragmento, o que por sua vez afeta a cobertura da sequenciação. Várias configurações focadas na ultrassonicação foram avaliadas e otimizadas para o ensaio TSO Comprehensive (UE) ([Tabela 4](#)). O tempo de cisalhamento foi ajustado para maximizar o indicador MEDIAN\_EXON\_COVERAGE descrito no [Controlo de qualidade na página 83](#). Os tempos de cisalhamento (destacados na [Tabela 4](#)) diferiram entre configurações, assim como os resultados MEDIAN\_INSERT\_SIZE. As três configurações foram testadas com régua de 8 tubos; os volumes utilizados são mostrados na [Tabela 4](#).

A otimização da configuração 3 (transdutor de ponto, água não desgaseificada, pequeno volume de banho-maria) utilizou pulsação e teve o menor tempo de cisalhamento, resultando numa distribuição ligeiramente maior do tamanho do fragmento em comparação com as outras duas configurações (MEDIAN\_INSERT\_SIZE foi aproximadamente 5 – 10 pares de bases maiores). Além disso, a configuração 3 precisava de uma entrada aumentada de ADN (50 ng), para alcançar uma entrada de MEDIAN\_EXON\_COVERAGE semelhante, em relação às outras duas configurações, que utilizavam a entrada nominal de 40 ng. A configuração 3 tem mais danos e/ou desnaturação e, portanto, uma massa eficaz reduzida de moléculas de ADN bicatenário utilizável para preparação do banco.

Centrifugue os tubos de cisalhamento durante o processo de recuperação para garantir que o volume especificado é recuperado, uma vez que qualquer perda de material pode afetar negativamente o desempenho.

Tabela 4 Configurações focadas na ultrassonificação avaliadas

Parâmetro	Configuração		
	1	2	3
Transdutor	Linha	Ponto	Ponto
Volume do banho-maria	5 l	5 l	85 ml
Água desgaseificada	Sim	Sim	Não
Unidade de refrigeração de água	Sim	Sim	Sim
Temperatura do banho-maria	7 °C	7 °C	12 °C
Potência de pico do incidente (PIP)	450 W	175 W	50 W
Fator de utilização %	30	10	30
Ciclos por sequência	200	200	1000
Pulsção (sequência de 10 seg.)	Não	Não	Sim
Tempo de cisalhamento	<b>250 s</b>	<b>280 s</b>	<b>200 s*</b>
Processamento de amostras	1–8	1	1
Tamanho do lote	1–96	1–96	1–8
Dimensão da amostra da régua de 8 tubos de vidro	130 µl	130 µl	50 µl
Equivalente de entrada de ADN (para cobertura mediana do exão)	40 ng	40 ng	50 ng

\* O tempo de cisalhamento de 200 segundos consiste em sequências de 10 segundos com 20 repetições.

## Taxa de rampa do termociclador

A taxa de rampa do termociclagem afeta os indicadores de CQ do ensaio — Centros utilizáveis com MSI, contagem média de recipientes da CNV visada, tamanho médio de inserto (ARN) — bem como leituras de apoio para variantes de união exão-intrão e fusões. Recomenda-se a otimização da taxa de rampa do termociclador. Por exemplo, foi ajustado um modelo testado a partir de uma taxa de rampa predefinida (e máxima) de 5 graus C/s para 3 graus C/s, para obter resultados comparáveis a outros modelos com taxas de rampa predefinidas mais baixas.

# Colheita, transporte e armazenamento de espécimes

Siga o procedimento normalizado ao colher, transportar, armazenar e processar amostras.

## Requisitos das amostras

### Tecido FFPE

O ensaio TSO Comprehensive (UE) requer ARN de 40 ng e/ou ADN de 40 ng extraído do tecido FFPE. A utilização de ARN e ADN permite a análise de todos os tipos de variantes pedidas. O tecido deve ser fixado utilizando fixador à base de formalina adequado para análises moleculares, por exemplo, formalina tamponada neutra a 10%. Não é possível descalcificar o tecido. Antes de realizar o ensaio TSO Comprehensive (UE), a amostra de tecido deve ser examinada por um patologista para garantir que é adequada para este teste. É necessário um conteúdo tumoral mínimo de 20% (por área), para detetar mutações somáticas do condutor. É necessário um conteúdo tumoral mínimo de 30% para detetar MSI elevada. O conteúdo tumoral para amplificações de genes e variantes de ARN depende da extensão da amplificação ou expressão da fusão (consulte [Conteúdo tumoral na página 105](#)).

Para uma elevada probabilidade de extrair ARN de 40 ng e ADN de 40 ng de uma variedade de tipos de tecido sólido, o volume de tecido recomendado é  $\geq 1,0 \text{ mm}^3$ , o que é equivalente a uma área de tecido viável cumulativa de  $\geq 200 \text{ mm}^2$ , utilizando secções de  $5 \mu\text{m}$  de espessura, ou  $\geq 100 \text{ mm}^2$ , utilizando secções de  $10 \mu\text{m}$  de espessura. Área de tecido cumulativa é a soma da área de tecido viável em todas as secções submetidas a extração. Por exemplo, pode ser obtida uma área de tecido cumulativa de  $200 \text{ mm}^2$  extraíndo quatro secções de  $5 \mu\text{m}$ , com uma área de tecido de  $50 \text{ mm}^2$  cada, ou cinco secções de  $10 \mu\text{m}$ , com uma área de tecido de  $20 \text{ mm}^2$  cada. A necrose dos tecidos pode diminuir a quantidade de ácido nucleico produzido. Para minimizar a possibilidade de resultados falsos negativos, o tecido pode ser macrodissecado para alcançar um conteúdo tumoral viável desejável.

Uma quantidade elevada de tecido necrótico ( $\geq 25\%$ ) pode interferir com a capacidade do ensaio TSO Comprehensive (UE) de detetar amplificações de genes e fusões de ARN.

## Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico

- Extraia ARN e ADN de amostras de tecido FFPE utilizando kits de extração disponíveis comercialmente. As diferenças nos kits de extração podem afetar o desempenho. Consulte [Avaliação de kits de extração de ácido nucleico na página 96](#).
- Armazene o ácido nucleico de reserva, extraído seguindo as instruções do fabricante do kit de extração.

- Para evitar alterações na concentração ao longo do tempo, meça o ADN e o ARN imediatamente antes de iniciar a preparação do banco. Quantifique o ARN e o ADN utilizando um método de quantificação fluorométrica que utiliza corantes de ligação de ácidos nucleicos. A concentração de ácido nucleico deve ser a média de pelo menos três medições.
- O ensaio requer 40 ng de cada amostra de ARN preparada em água sem-RNase/DNase (não fornecida), com um volume final de 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- O ensaio requer 40 ng de cada amostra de ADN genómico com uma concentração de extração mínima de 3,33 ng/µl. O cisalhamento requer um volume final de 52 µl (0,77 ng/µl) com um mínimo de 40 µl de TEB (fornecido) utilizado como diluente.

## Armazenamento de bancos

Armazene os bancos em placas PCR de baixa ligação durante 7 a 30 dias, dependendo do tipo de banco (consulte a [Tabela 5](#)).

Tabela 5 Tempos de armazenamento do banco

Tipo de banco	Placa	Número de dias	Temperatura de armazenamento
ADNc	PCF PCR	≤ 7	-25 °C a -15 °C
ADN genómico fragmentado	LP PCR	≤ 7	-25 °C a -15 °C
Pré-enriquecimento	ALS PCR	≤ 30	-25 °C a -15 °C
Pós-enriquecimento	ELU2 PCR	≤ 7	-25 °C a -15 °C
PCR pós-enriquecimento	PL PCR	≤ 30	-25 °C a -15 °C
Normalizado	NL PCR	≤ 30	-25 °C a -15 °C

# Advertências e precauções

## Segurança

1. **Alguns componentes deste ensaio contêm químicos potencialmente perigosos. Podem ocorrer danos corporais por inalação, ingestão, contacto com a pele e contacto ocular. Use equipamento de proteção, incluindo proteção ocular, luvas e bata de laboratório adequados para o risco de exposição. Manuseie os reagentes usados como resíduos químicos e elimine-os de acordo com a legislação e os regulamentos locais, regionais e nacionais aplicáveis.** Para consultar as Fichas de Dados de Segurança (SDS), visite [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
2. Manuseie todas as amostras como se fossem consideradas infecciosas.
3. Aplique as precauções de rotina do laboratório. Não coloque a pipeta na boca. Não coma, beba ou fume nas áreas designadas para trabalho. Use luvas descartáveis e batas de laboratório quando manusear amostras e reagentes de ensaio. Lave bem as mãos depois de manusear amostras e reagentes de ensaio.

## Laboratório

1. Para evitar a contaminação, organize o laboratório com um fluxo de trabalho unidirecional. As áreas de pré-amplificação e pós-amplificação têm de ter equipamento e materiais dedicados (por exemplo, pipetas, pontas de pipeta, agitador tipo vórtex e centrifugador). Para evitar a contaminação cruzada do produto ou da sonda de amplificação, evite regressar à área de pré-amplificação depois de entrar na área de pós-amplificação.
2. Execute os passos de PCR de índice e enriquecimento numa área de pós-amplificação, para evitar a contaminação cruzada do produto de amplificação.
3. Os procedimentos de preparação do banco requerem um ambiente sem- RNase/DNase. Descontamine completamente as áreas de trabalho com um produto de limpeza inibidor de-RNase/DNase. Utilize plásticos certificados como isentos de DNase, RNase e ADN genómico humano.
4. Para procedimentos pós-amplificação, limpe bem as superfícies de trabalho e o equipamento, antes e depois de cada procedimento, com uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 0,5% recém-preparada. Deixe a solução entrar em contacto com as superfícies durante 10 minutos e, em seguida, limpe cuidadosamente com álcool etílico ou isopropílico a 70%.
5. Utilize tubos, placas, pontas de pipeta e reservatórios de microcentrifugação sem nuclease.
6. Utilize equipamento calibrado ao longo do ensaio. Certifique-se de calibrar o equipamento para as velocidades, temperaturas e volumes especificados neste protocolo.
7. Utilize pipetas de precisão para garantir o fornecimento exato de reagentes e de amostras. Calibre regularmente de acordo com as especificações do fabricante.
8. Utilize as seguintes orientações, quando utilizar pipetas multicanal:
  - Pipete um mínimo de  $\geq 2 \mu\text{l}$ .

- Certifique-se de que as pontas de barreira estão bem ajustadas e são adequadas para a marca e modelo de pipeta multicanal.
  - Fixe as pontas com um movimento de rotação, para certificar-se de que todas as pontas se fixam igualmente bem.
  - Aspire num ângulo de 90°, com níveis de volume iguais de líquido em todas as pontas.
  - Misture todos os componentes, após a administração, pipetando a mistura de reação para cima e para baixo.
  - Após a distribuição, certifique-se de que o líquido é distribuído a partir de cada ponta.
9. Certifique-se de que utiliza o equipamento especificado para o ensaio e de que define os programas conforme indicado.
10. As temperaturas indicadas para o termociclador e a incubadora de microamostras indicam a temperatura de reação, não necessariamente a temperatura definida do equipamento.

## Ensaio

1. Evite a contaminação cruzada.
  - Siga as práticas laboratoriais adequadas, ao manusear amostras e reagentes.
  - Utilize consumíveis de laboratório novos e pontas de pipetas novas, entre amostras e entre a distribuição de reagentes.
  - Utilize pontas resistentes a aerossóis para reduzir o risco de contaminação cruzada.
  - Utilize um fluxo de trabalho unidirecional ao passar da pré-amplificação para as áreas pós-amplificação.
  - Manuseie e abra apenas um primer de indexação de cada vez. Volte a tapar cada tubo para indexação, imediatamente após a utilização. São fornecidas tampas adicionais no kit.
  - Mude de luvas com frequência e se entrarem em contacto com primers de indexação ou amostras.
  - Retire os tubos de primer de indexação não utilizados da área de trabalho.
  - Não volte a colocar os reagentes nos tubos de reserva após a utilização com uma régua de tubos, cuba ou reservatório.
  - Misture as amostras com uma pipeta e centrifugue a placa, quando indicado.
  - Utilize um agitador de microplacas. Não agite as placas no vórtex.
2. Não troque componentes de ensaio de lotes diferentes de kits de reagentes. Os lotes do kit de reagentes são identificados no rótulo da respetiva caixa e na folha do lote principal.
3. É necessário que sejam implementadas as devidas práticas laboratoriais para evitar as nucleases e que os produtos PCR contaminem reagentes, instrumentos, amostras e bancos. A nuclease e a contaminação de produtos PCR pode causar resultados imprecisos e não fiáveis.
4. É necessário um tipo de placa adequado para um desempenho e armazenamento ideais do ensaio. Certifique-se de que segue as instruções de transferência de placas nas [Instruções de utilização na página 41](#).

5. O não seguimento dos procedimentos, da forma descrita, pode resultar em resultados erróneos ou na redução significativa da qualidade dos bancos.
6. A menos que seja especificado um ponto de paragem segura nas [Instruções de utilização na página 41](#), avance imediatamente para o passo seguinte.
7. Armazene os reagentes ou componentes do ensaio à temperatura especificada nas áreas designadas de pré-amplificação e pós-amplificação.
8. Não armazene os reagentes numa unidade de armazenamento sem gelo ou em compartimentos de porta do frigorífico.
9. Não congele reagentes que contenham esférulas (LNB1, SPB e SMB).
10. Não utilize reagentes que tenham sido armazenados incorretamente.
11. Não se desvie dos procedimentos de mistura e manuseamento especificados para cada reagente. Uma mistura inadequada ou a agitação excessiva de reagentes com o vórtex pode resultar em resultados de amostra falhados.
12. Prepare misturas principais frescas e elimine o volume restante, após a utilização.
13. Prepare sempre etanol novo a 80% com água sem RNase/DNase, para os passos de lavagem. O etanol pode absorver água do ar, que pode alterar os resultados. Elimine o etanol a 80% após a utilização, de acordo com os regulamentos locais, de cada estado e/ou federais.
14. Transferir o volume especificado de eluato. A transferência de um volume de eluato inferior ao especificado, durante os passos de eluição, pode ter impacto nos resultados.
15. Utilize as seguintes orientações para os ultrassonicadores. Certifique-se de que segue as instruções do fabricante.
  - Carregue lentamente o ADN genómico no tubo do ultrassonicador, para evitar a formação de bolhas. Bolhas excessivas ou uma folga de ar no tubo de cisalhamento podem levar à fragmentação incompleta.
  - Distribua lentamente nos tubos do ultrassonicador e evite salpicos.
  - Para evitar a deslocação do fluido e a perda da amostra, não insira a ponta da pipeta no fundo do tubo ultrassonicador, ao remover o ADN fragmentado.
16. Não pipete menos de 2 µl de amostra.
17. Não utilize uma cuba para dispensar reagentes em passos, que exijam a adição de menos de 10 µl de material a cada poço de amostras.
18. Utilize uma pipeta P20 ao transferir uma amostra de ADN genómico fragmentada dos tubos do sonicador para a placa de Preparação de Bancos (LP).
19. Não combine adaptadores UMI e SUA1.
20. Utilize adaptadores SUA1 com amostras de ARN.
21. Utilize adaptadores UMI com amostras de ADN.
22. Atribua diferentes primers de indexação a cada amostra de banco, para identificar exclusivamente cada banco, quando é agrupada para sequenciação numa única célula de fluxo.
23. Não combine primers de indexação CPxx e UPxx no mesmo banco.



24. As divergências entre as amostras e os primers de indexação resultam na comunicação incorreta de resultados, devido à perda da identificação positiva da amostra. Introduza ID de amostras e atribua índices no Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE), antes de iniciar a preparação do banco. Registre os ID de amostras, indexação e orientação do poço da placa, para referência durante a preparação do banco.
25. Para bancos derivados de amostras de ARN, utilize apenas índices UPxx.
26. Para bancos derivados de amostras de ADN, utilize índices UPxx ou CPxx.
27. Sequência 8 bancos de ARN e 8 bancos de ADN por célula de fluxo. Consulte [Número de bancos e seleção de índices na página 38](#).
28. Sequência de, no mínimo, três bancos. Siga as diretrizes em [Número de bancos e seleção de índices na página 38](#).
29. Após o passo de ligação em [Captar alvos um na página 63](#) e [Captar alvos dois na página 67](#), prossiga imediatamente para o passo de lavagem, para evitar que os pellets de esférulas sequem.
30. Certifique-se de que todo o etanol a 80% é removido do fundo dos poços, durante os passos de lavagem. O etanol residual pode alterar os resultados.
31. Para um desempenho ideal do ensaio, siga o número especificado de lavagens indicado nas [Instruções de utilização na página 41](#).
32. Durante o procedimento [Normalizar bancos na página 73](#), ressuspenda completamente o pellet de esférulas do banco, para obter uma densidade de cluster consistente na célula de fluxo.

## Notas processuais

- O fluxo de trabalho do TSO Comprehensive (UE) pode ser realizado de acordo com o seguinte calendário.
    - Dia 1: Síntese de ADNc a partir de amostras de ARN, fragmentação de ADN de amostras de ADN genómico, preparação da bancos e início da hibridação noturna (primeira).
    - Dia 2: Enriquecimento, normalização de bancos enriquecidos e carregamento de bancos no Instrumento NextSeq 550Dx.
- Se não for possível realizar o fluxo de trabalho do TSO Comprehensive (UE), de acordo com este calendário, são especificados vários pontos de paragem segura ao longo do protocolo. A menos que seja especificado um ponto de paragem segura no protocolo, avance imediatamente para o passo seguinte.
- Os bancos derivados de amostras de ARN e ADN podem ser preparados simultaneamente em poços separados.
  - As tabelas de preparação da mistura principal, incluem excesso de volume para garantir que existe volume suficiente para o número de amostras a serem processadas.
  - Utilize água de grau molecular sem nucleases.
  - Após a adição do reagente, enxague a ponta aspirando e dispensando uma vez no poço adequado da placa, salvo especificação em contrário no procedimento.
  - A temperatura ambiente é definida entre 15 °C a 30 °C.

### Programas do termociclador

- Programe os programas do termociclador em equipamento de pré-amplificação e pós-amplificação, antes de iniciar o protocolo.
- Certifique-se de que as placas PCR encaixam bem no termociclador.
- Utilize as placas recomendadas pelo fabricante do termociclador.

### Colocar e retirar selos da placa

- Sele sempre as placas com um novo selo autocolante da placa. Não reutilize os selos.
- Para selar a placa, aplique firmemente a tampa adesiva na mesma, com um selante de extremidades ou rolo compressor.
- Sele sempre a placa de 96 poços com um selo autocolante novo, antes dos seguintes passos do protocolo.
  - Passos de agitação da placa
  - Passos de centrifugação
  - Passos da termociclagem
  - Hibridações

- Armazenamento a longo prazo
- Certifique-se de que as extremidades e os poços estão selados, para reduzir o risco de contaminação cruzada e evaporação.
- Coloque a placa numa superfície plana antes de remover lentamente o selo.
- Antes de retirar o selo, se observar qualquer fluido ou condensação no mesmo ou nas paredes laterais dos poços da placa, centrifugue a 280 × g, durante 1 minuto.
- Utilize selos autocolantes das placas que sejam eficazes entre -40 °C e 110 °C e que estejam indicados para placas PCR com saia ou semi-saia.

## Equipamento

- Certifique-se de que o pessoal do laboratório está familiarizado com as instruções do fabricante, para o funcionamento e manutenção de todo o equipamento, antes de iniciar o ensaio.

## Tipo de placa e transferências de placa

- É necessário um tipo de placa adequado para um desempenho e armazenamento ideais do ensaio.
- Ao transferir volumes entre placas, transfira o volume especificado de cada poço de uma placa para o poço correspondente da placa de destino.
- As pipetas multicanais podem ser utilizadas para transferir amostras entre tubos ou placas.
- Utilize as seguintes diretrizes ao agitar as placas.
  - Utilize um agitador de placas para agitar as placas. Não agite as placas no vórtex.
  - Agite as placas PCR a 1200 rpm.
  - Agite as placas MIDI a 1800 rpm.
  - Siga as instruções do fabricante para certificar-se que o agitador de placas mantém a placa segura.

## Centrifugação

- Quando as instruções no protocolo indicarem centrifugar brevemente, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- Se for observado líquido nos lados de um poço ou no selo, centrifugue a placa a 280 × g durante 1 minuto.

## Manuseamento de reagentes

- Volte a tapar bem todos os tubos de reagente imediatamente após a utilização, para limitar a evaporação e evitar a contaminação.
- Volte a colocar os reagentes à temperatura de armazenamento especificada, quando já não forem necessários para um procedimento.

- Siga a preparação do reagente que precede cada secção do procedimento das [Instruções de utilização na página 41](#).
- Certifique-se de que prepara o volume necessário de mistura principal, mistura de eluição e etanol a 80% para o número de amostras que processa.
- Os volumes fornecidos na mistura principal e nas tabelas de solução contêm excedentes. Os cálculos do volume excedente são os seguintes.
  - **Tabela 14**
    - Volume de FSM =  $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{número de amostras} + \text{controlos}) \times (1,25)$ .
    - Volume de RVT =  $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{número de amostras} + \text{controlos}) \times (1,25)$ .
  - **Tabela 21**
    - Volume de ERA1-B =  $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (1,20)$ .
    - Volume de ERA1-A =  $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (1,20)$ .
  - **Tabela 29**
    - Volume de EE2 =  $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (1,364)$ .
    - Volume de HP3 =  $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (1,364)$ .
  - **Tabela 30**
    - Volume de EE2 =  $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (1,364)$ .
    - Volume de HP3 =  $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (1,364)$ .
  - **Tabela 36**
    - Volume de LNA1 =  $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (2,0)$ .
    - Volume de LNB1 =  $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (2,0)$ .
  - **Tabela 37**
    - Volume de EE2 =  $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (1,25)$ .
    - Volume de HP3 =  $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{número de bancos}) \times (1,25)$ .

## Conjuntos de adaptadores

- O ensaio TSO Comprehensive (UE) inclui adaptadores SUA1 e UMI.
- Os adaptadores SUA1 destinam-se a ser utilizados com amostras de ARN, não de ADN.
- Os adaptadores UMI destinam-se a ser utilizados com amostras de ADN, não de ARN.

## Manuseamento de esférulas

- São incluídos três tipos de esférulas no ensaio TSO Comprehensive (UE) (SPB, SMB e LNB1). Certifique-se de que é utilizado o tipo de esférula correto, durante o procedimento.

- Realize o número correto de lavagens para cada tipo de esférula.
- Certifique-se de que as esférulas estão à temperatura ambiente, antes de utilizar.
- Misture as esférulas durante 1 minuto, antes da utilização para garantir a homogeneidade.
- Utilize as seguintes orientações, ao misturar esférulas com uma pipeta.
  - Utilize uma pipeta e um tamanho de ponta adequados para o volume que mistura.
  - Ajuste a definição de volume para aproximadamente 50–75% do volume da amostra.
  - Pipete lentamente sem soltar o êmbolo.
  - Evite salpicar e introduzir bolhas.
  - Posicione a ponta da pipeta acima do pellet e dispense diretamente no mesmo para libertar as esférulas do poço ou tubo.
  - Certifique-se de que o pellet de esférulas está totalmente na solução. A solução deve ter uma aparência castanha escura e uma consistência homogênea.
  - Avalie se está presente um pellet de esférulas. Aspire cuidadosamente a solução de esférulas total do poço na ponta e olhe para o fundo dos poços.
- Se as esférulas forem aspiradas para as pontas de pipeta, durante os passos de separação magnética, coloque-as de volta na placa do poço no suporte magnético. Aguarde até que o líquido esteja limpo (aproximadamente 2 minutos), antes de avançar para o passo seguinte do procedimento.
- Ao lavar esférulas:
  - Utilize o suporte magnético recomendado para a placa.
  - Dispense líquido diretamente no pellet de esférulas, de modo a que as esférulas na parte lateral dos poços fiquem humedecidas.
  - Mantenha a placa no suporte magnético, até que o procedimento especifique a sua remoção.
  - Não agite a placa enquanto esta estiver no suporte magnético.
  - Enquanto estiver no suporte magnético, não perturbe o pellet de esférulas.
- Quando lavar esférulas ou remover sobrenadante, incline as pontas de pipeta no fundo dos poços, para evitar criar vácuo e puxar a solução para dentro dos filtros de pontas de pipeta.

#### Formulário de acompanhamento laboratorial

- O *Formulário de acompanhamento laboratorial TruSight Oncology Comprehensive (UE)* (documento n.º 200009022) fornece uma lista de verificação dos passos do protocolo.

## Número de bancos e seleção de índices

Antes da configuração do ensaio, planeie o número de bancos e índices de amostras para o ensaio de sequenciação. As seguintes diretrizes de número de amostras incluem controlos positivos, mas excluem controlos negativos/sem modelo (NTC). Os NTC devem ser adicionados ao ensaio planeado como amostra adicional.

Para TSO Comprehensive (UE), siga as diretrizes na [Tabela 6](#) e na [Tabela 7](#), para determinar o número de bancos a sequenciar numa célula de fluxo.

Tabela 6 Bancos de ARN ou ADN para TSO Comprehensive (UE)

Tipo de banco	Mínimo*	Máximo
ARN	3	16
ADN	3	8

Para uma utilização ideal dos reagentes, durante a sequenciação TSO Comprehensive (UE) no Instrumento NextSeq 550Dx, sequenciar 8 bancos de ARN + 8 bancos de ADN por célula de fluxo.

Tabela 7 Bancos de ARN e ADN combinados para TSO Comprehensive (UE)

Número de bancos de ADN	Número de bancos de ARN
8	8

Durante a preparação do banco, adicione o primer de indexação a cada banco de amostras. *Utilize uma mistura diferente de primer de indexação para cada banco de amostras.* Os primers de indexação identificam exclusivamente cada amostra, para que os bancos possam ser agrupados para sequenciação numa célula de fluxo. (As combinações de índices compatíveis são apresentadas no ecrã Create Run (Criar ensaio), durante a configuração do ensaio no Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE).) Certifique-se de que os primers de indexação que utiliza com amostras correspondem aos índices que seleciona para análise com o Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE). *As divergências resultam na comunicação incorreta de resultados, devido à perda da identificação positiva da amostra.* Existem dois tipos de índices no ensaio TSO Comprehensive (UE).

- **UPxx indexes** (Índices UPxx) — Utilize índices UPxx para bancos derivados de amostras de ARN ou ADN.
- **CPxx indexes** (Índices CPxx) — Utilize índices CPxx para bancos derivados de amostras de ADN. Não utilize índices CPxx para bancos derivados de ARN ou se estiver a sequenciar três bancos de ADN no total.

Ao sequenciar apenas três bancos, é necessário o seguinte.

- Os bancos devem ser todos de ADN ou de ARN.

- Não utilize conjuntos de índices CPxx.
- Um dos seguintes conjuntos de índices UPxx é necessário para fornecer diversidade suficiente.
  - UP01, UP02 e UP03
  - UP04, UP05 e UP06
  - UP07, UP08 e UP09
  - UP10, UP11 e UP12

Por exemplo, o primeiro banco é atribuído a UP01, o segundo banco a UP02 e o terceiro banco a UP03.

## Controlos do TruSight Oncology

O TSO Comprehensive (UE) requer a utilização do Controlos do TruSight Oncology, que consiste no controlo do ADN TruSight Oncology e no controlo do ARN TruSight Oncology, como controlos positivos. Inclua o controlo do ADN TruSight Oncology para cada ensaio de sequenciação de ADN e o controlo de ARN TruSight Oncology para cada ensaio de sequenciação de ARN, num determinado evento de preparação do banco (incluir também controlos para ensaios combinados de ADN e ARN). É preparado um controlo único positivo para cada ensaio de sequenciação planeado.

Inclua um NTC em cada ARN e em cada evento de preparação do banco de ADN. O NTC é sequenciado repetidamente, dentro de um evento de preparação do banco. Siga estas orientações para o Controlos do TruSight Oncology:

- Prepare bancos a partir de controlos positivos e sem modelo idênticos às amostras.
- Utilize TEB para o NTC de ADN.
- Utilize água sem DNase/RNase para o NTC de ARN.
- Os controlos positivos estão incluídos no requisito máximo do banco.
- Os NTC não estão incluídos no requisito mínimo do banco.
- Utilize índices UP para o NTC, quando sequenciar 3 bancos.
- Como o NTC é sequenciado repetidamente, os índices selecionados para este controlo não podem ser repetidos, no evento de preparação do banco.

As tabelas abaixo mostram esquemas de placas de exemplo, para preparação do banco. Cada coluna numerada representa um único ensaio de sequenciação. Nas sequências conjuntas de bancos de ADN e de ARN, cada conjunto de colunas correspondente representa um único ensaio de sequenciação (por exemplo, coluna 1 e coluna 7). O NTC é sequenciado para cada coluna ou conjunto de colunas.

Tabela 8 Evento de preparação do banco de um único ensaio, incluindo amostras de seis doentes

	1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>	Pós- controlo de ADN	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	Pós- controlo de ARN
<b>B</b>	ADN 1	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	ARN 1
<b>C</b>	ADN 2	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	ARN 2
<b>D</b>	ADN 3	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	ARN 3
<b>E</b>	ADN 4	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	ARN 4
<b>F</b>	ADN 5	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	ARN 5
<b>G</b>	ADN 6	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	ARN 6
<b>H</b>	ADN NTC	vazio	vazio	vazio	vazio	vazio	NTC de ARN

Tabela 9 Evento de preparação do banco de três ensaios, incluindo amostras de 20 doentes

	1	2	3	4	5	6	7
<b>A</b>	Pós- controlo de ADN	Pós- controlo de ADN	Pós- controlo de ADN	vazio	Pós- controlo de ARN	Pós- controlo de ARN	Pós- controlo de ARN
<b>B</b>	ADN 1	ADN 7	ADN 14	vazio	ARN 1	ARN 7	ARN 14
<b>C</b>	ADN 2	ADN 8	ADN 15	vazio	ARN 2	ARN 8	ARN 15
<b>D</b>	ADN 3	ADN 9	ADN 16	vazio	ARN 3	ARN 9	ARN 16
<b>E</b>	ADN 4	ADN 10	ADN 17	vazio	ARN 4	ARN 10	ARN 17
<b>F</b>	ADN 5	ADN 11	ADN 18	vazio	ARN 5	ARN 11	ARN 18
<b>G</b>	ADN 6	ADN 12	ADN 19	vazio	ARN 6	ARN 12	ARN 19
<b>H</b>	ADN NTC	ADN 13	ADN 20	vazio	NTC de ARN	ARN 13	ARN 20



# Instruções de utilização

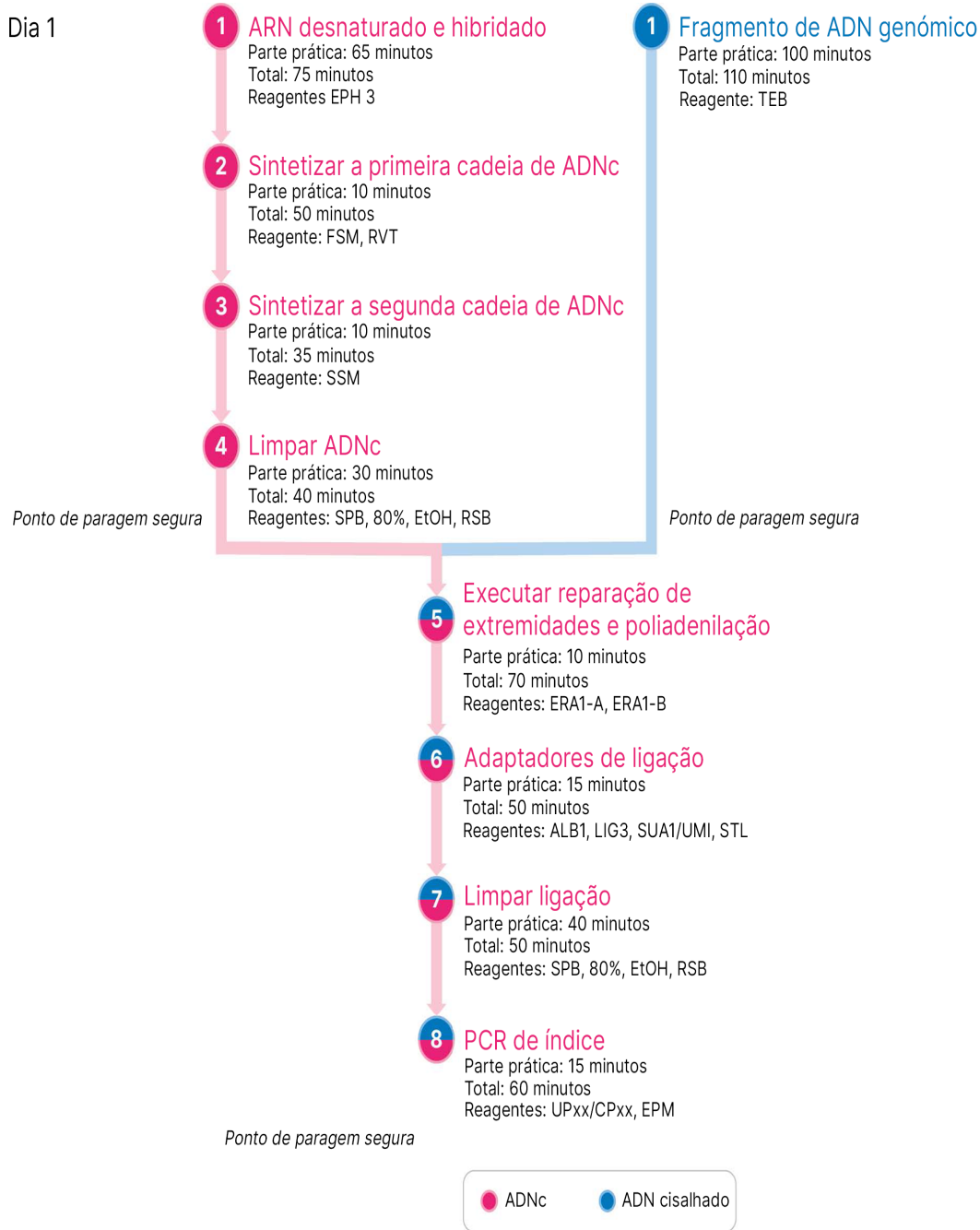
É mostrada uma visão geral do fluxo de trabalho TSO Comprehensive (UE) na [Figura 1](#) e [Figura 2](#).

## Fluxo de trabalho de preparação de banco

[Figura 1](#) ilustra o fluxo de trabalho de preparação de banco para TSO Comprehensive (UE). Os bancos de amostras de ARN e ADN podem ser preparadas simultaneamente em poços separados. Os controlos positivos e os controlos sem modelo são processados de forma idêntica às amostras. Os pontos de paragem segura estão marcados entre os passos.

Antes de iniciar o protocolo, introduza as informações relativas a amostras e do ensaio numa ficha de amostras v2 a utilizar com o Módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE). Consulte o Manual do fluxo de trabalho do módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (documento n.º 200008661).

Figura 1 Fluxo de trabalho do TSO Comprehensive (UE) (Parte 1)

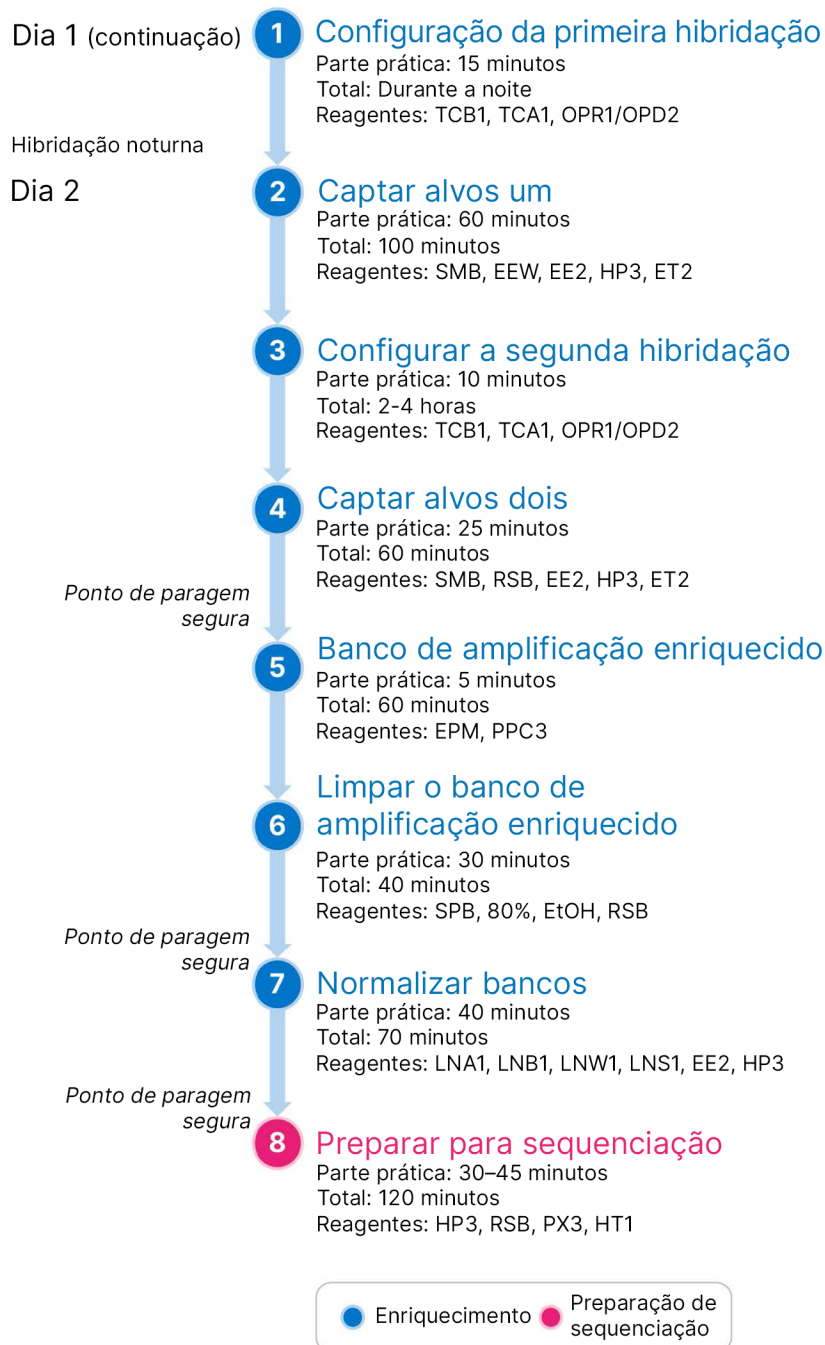


\* Os tempos práticos e totais são aproximados.

## Fluxo de trabalho de enriquecimento

Figura 2 ilustra o fluxo de trabalho de enriquecimento para o TSO Comprehensive (UE). Os pontos de paragem segura estão marcados entre os passos.

Figura 2 Fluxo de trabalho do TSO Comprehensive (UE) (Parte 2)



## Programar termocicladores

Antes de iniciar o ensaio, guarde os seguintes programas nos termocicladores pré e pós-amplificação.

Tabela 10 Conjunto de programas do termociclador de pré-amplificação

Passo do procedimento	Nome do programa	Temperatura da tampa	Volume de reação	Parâmetros do termociclador
ARN desnaturado e hibridado	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 65 °C durante 5 minutos</li> <li>• 4 °C durante 1 minuto</li> <li>• Retenção a 4 °C</li> </ul>
Sintetizar a primeira cadeia de ADNc	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 °C durante 10 minutos</li> <li>• 42 °C durante 15 minutos</li> <li>• 70 °C durante 15 minutos</li> <li>• 4 °C durante 1 minuto</li> <li>• Retenção a 4 °C</li> </ul>
Sintetizar a segunda cadeia de ADNc	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 °C durante 25 minutos</li> <li>• 4 °C durante 1 minuto</li> <li>• Retenção a 4 °C</li> </ul>

**NOTA** Se a temperatura da tampa para o 2ndSS não puder ser definida para 30 °C, desligue a opção de aquecimento da tampa pré-aquecida.

Tabela 11 Programas do termociclador de pós-amplificação

Passo do procedimento	Nome do programa	Temperatura da tampa	Volume de reação	Parâmetros do termociclador
PCR de índice	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C durante 30 segundos</li> <li>• 15 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C durante 10 segundos</li> <li>• 60 °C durante 30 segundos</li> <li>• 72 °C durante 30 segundos</li> </ul> </li> <li>• 72 °C durante 5 minutos</li> <li>• Retenção a 10 °C</li> </ul>

Passo do procedimento	Nome do programa	Temperatura da tampa	Volume de reação	Parâmetros do termociclador
Realizar a primeira hibridação	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C durante 10 minutos</li> <li>• 85 °C durante 2 minutos e 30 segundos</li> <li>• 75 °C durante 2 minutos e 30 segundos</li> <li>• 65 °C durante 2 minutos e 30 segundos</li> <li>• 57 °C Manter durante 8 a 24 horas</li> </ul>
Realizar a segunda hibridação	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C durante 10 minutos</li> <li>• 85 °C durante 2 minutos e 30 segundos</li> <li>• 75 °C durante 2 minutos e 30 segundos</li> <li>• 65 °C durante 2 minutos e 30 segundos</li> <li>• 57 °C Manter durante 1,5 a 4 horas</li> </ul>
Banco de amplificação enriquecido	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C durante 30 s</li> <li>• 18 ciclos de: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C durante 10 s</li> <li>• 60 °C durante 30 s</li> <li>• 72 °C durante 30 s</li> </ul> </li> <li>• 72 °C durante 5 minutos</li> <li>• Retenção a 10 °C</li> </ul>

## Passos de preparação do protocolo

1. Descontamine completamente as áreas de trabalho com um produto de limpeza inibidor de RNase/DNase.



### ATENÇÃO

Todos os procedimentos no fluxo de trabalho requerem um ambiente sem RNase/DNase.

2. Conjunto de programas do termociclador de pré-amplificação. Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).
3. Siga as instruções do fabricante para configurar o ultrassonicador.
4. Se processar apenas amostras de ADN, prossiga diretamente para [Fragmento de ADN genómico na página 51](#).
5. Retire os controlos de ARN do armazenamento.

6. Retire os tubos de reagente da caixa e siga as instruções de descongelamento.

Tabela 12 Preparação de banco de ARN no TruSight Oncology Comp (PN 20031127)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
EPH3	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente	ARN desnaturado e hibridado
FSM	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente	Sintetizar a primeira cadeia de ADNc
RVT	-25 °C a -15 °C	Mantenha em gelo	Sintetizar a primeira cadeia de ADNc
SSM	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente	Sintetizar a segunda cadeia de ADNc

Tabela 13 Preparação de banco (Refrigerado) no TruSight Oncology Comp (PN 20031119)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
SPB (etiqueta verde clara)	2 °C a 8 °C	Coloque à temperatura ambiente durante 30 minutos.	Limpar ADNc
RSB	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Limpar ADNc

## ARN desnaturado e hibridado

Este processo desnatura ARN purificado e prepara com hexâmeros aleatórios na preparação para a síntese de ADNc.

### Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes.
  - EPH3 — Reserve.
  - FSM — Agite com o vórtex para misturar. Centrifugue brevemente e, em seguida, pipete para misturar. O reagente pode conter partículas brancas relacionadas com o produto. Não é necessária nenhuma ação por parte do utilizador. Não há impacto no desempenho do produto.
  - RVT — Centrifugue brevemente e, em seguida, pipete para misturar. Mantenha em gelo.

**NOTA** RVT é uma solução viscosa. Minimize a formação de bolhas, durante a pipetagem.

2. Num tubo de microcentrifugação, combine os seguintes volumes para preparar uma Mistura Principal FSM + RVT.

Tabela 14 Mistura Principal FSM + RVT

Componente de mistura principal	4 bancos (µl)	8 bancos(µl)	16 bancos (µl)	24 bancos (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

Esta tabela inclui excesso de volume. Consulte [Manuseamento de reagentes na página 35](#) para cálculos.

- Pipete dez vezes para misturar.
- Coloque a mistura principal FSM + RVT em gelo até [Sintetizar a primeira cadeia de ADNc na página 48](#).

## Procedimento

- Descongele as amostras de ARN extraído e os controlos de ARN em gelo. Processe os controlos de ARN como amostras, para o resto do protocolo.
- Armazene o ARN em gelo, quando não estiver a ser utilizado. Consulte [Requisitos das amostras na página 28](#) para quantificar as amostras.
- Pipete cada amostra de ARN 10 vezes para misturar.
- Utilize água sem RNase/DNase para preparar 40 ng de cada amostra de ARN, num volume final de 8,5 µl (4,7 ng/µl).  
Para controlos de ARN, utilize a concentração indicada no rótulo do tubo.
- Rotule uma nova placa PCR de CF (fragmentos de ADNc) de 96 poços.
- Adicione 8,5 µl de cada amostra de ARN a um poço único da placa CF PCR.
- Certifique-se de que o esquema da placa de amostras corresponde ao ensaio planeado no Módulo de análise do TSO Comprehensive (UE), durante a configuração do ensaio.
- Agite com o vórtex o EPH3 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
- Adicione 8,5 µl de EPH3 a cada poço de amostras.
- Aplique o selo autocolante da placa na placa CF PCR.



### ATENÇÃO

Certifique-se que sela completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.

- Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
- Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
- Coloque no termociclador e execute o programa LQ-RNA.  
Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).
- Quando as amostras atingirem os 4 °C, aguarde um minuto e, em seguida, prossiga imediatamente para o passo seguinte.

## Sintetizar a primeira cadeia de ADNc

Este processo transcreve inversamente os fragmentos de ARN preparados com hexâmeros aleatórios para o ADNc de primeira cadeia utilizando transcriptase reversa.

### Procedimento

1. Retire a placa CF PCR do termociclador.
2. Pipete 10 vezes para misturar a mistura principal FSM + RVT. Certifique-se de que a mistura FSM + RVT é completamente homogênea.
3. Adicione 8 µl de mistura principal FSM + RVT a cada poço de amostras.
4. Pipete 10 vezes para misturar.
5. Elimine a mistura principal FSM + RVT restante.
6. Aplique o selo autocolante da placa na placa CF PCR.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
7. Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
8. Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
9. Coloque num termociclador e execute o programa 1stSS.  
Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).
10. Quando as amostras atingirem 4 °C, prossiga imediatamente para o passo seguinte.  
As amostras da primeira cadeia podem ser mantidas a 4 °C por um período máximo de 5 minutos.

## Sintetizar a segunda cadeia de ADNc

Este processo remove o modelo de ARN e sintetiza ADNc de cadeia dupla.

### Preparação

1. Prepare o seguinte reagente.
  - SSM — Inverta 10 vezes para misturar. Centrifugue brevemente.

### Procedimento

1. Retire a placa CF PCR do termociclador.
2. Adicione 25 µl de SSM a cada poço de amostras.
3. Aplique o selo autocolante da placa na placa CF PCR.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
4. Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
5. Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.
6. Coloque num termociclador e execute o programa 2ndSS.



Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).

- Quando as amostras atingirem os 4 °C, aguarde um minuto e, em seguida, prossiga imediatamente para o passo seguinte.

## Limpar ADNc

Este processo utiliza as SPB para purificar o ADNc de componentes de reação indesejados. As esférulas são lavadas duas vezes com etanol novo a 80%. O ADNc é eluído com o RSB.

### Preparação

- Prepare os seguintes reagentes.
  - SPB — Certifique-se de que as esférulas estão à temperatura ambiente, durante 30 minutos.
  - RSB — Ponha de lado para utilização no procedimento.
- Prepare EtOH novo a 80% num tubo cónico de 15 ml ou 50 ml.

Tabela 15 Preparar novo EtOH a 80%

Reagente	4 bancos	8 bancos	16 bancos	24 bancos
Ethanol 100%, puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

- Agite com o vórtex o EtOH novo a 80% para misturar.
- Rotule uma nova placa MIDI de BIND1 (ligação de ADNc) de 96 poços.
- Cubra e reserve.
- Instale o íman.

### Procedimento

#### Ligue

- Retire a placa CF PCR do termociclador.
- Agite com o vórtex as SPB durante 1 minuto, para ressuspender as esférulas.
- Adicione imediatamente 90 µl de SPB a cada poço de amostras da placa MIDI de BIND1.  
Se utilizar uma cuba para dispensar as SPB, inclua um fator de excesso de 1,05 ao obter alíquotas de material suficiente por amostra. Elimine qualquer material restante depois de as SPB terem sido adicionadas a cada poço de amostras.
- Transfira todo o volume de 50 µl de cada poço da placa CF PCR para o poço correspondente da placa MIDI de BIND1.
- Elimine a placa CF PCR vazia.

6. Aplique o selo autocolante da placa na placa MIDI de BIND1.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
7. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
8. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
9. Coloque a placa MIDI de BIND1 num suporte magnético durante 5 minutos.
10. Utilize um conjunto de pipetas P200 definidas para 200 µl, para remover e eliminar todo o sobrenadante de cada poço de amostras, sem perturbar os pellets de esférulas.

## Lavagem

1. Lave as esférulas da seguinte forma.
  - a. Mantenha em suporte magnético e adicione 200 µl de EtOH novo a 80% a cada poço.
  - b. Aguarde 30 segundos.
  - c. Remova e elimine todo o sobrenadante de cada poço.
2. Lave as esférulas uma *segunda* vez.
3. Remova o EtOH residual de cada poço.  
Utilize uma pipeta P20 com pontas finas.
4. Elimine o EtOH a 80% não utilizado.

## Eluir

1. Retire a placa MIDI de BIND1 do suporte magnético.
2. Inverta ou agite com o vórtex o RSB para misturar.
3. Adicione 22 µl de RSB a cada poço de amostras.
4. Aplique o selo autocolante da placa na placa MIDI de BIND1.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
5. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
6. Incube à temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
8. Rotule uma nova placa MIDI de PCF (fragmentos purificados de ADNc) de 96 poços.  
Se estiver a parar no [PONTO DE PARAGEM SEGURA na página 51](#), utilize uma placa PCR.
9. Transfira 20 µl de eluato de cada poço de amostras da placa MIDI de BIND1 para o poço correspondente da placa de PCF.
10. Elimine a placa MIDI de BIND1 vazia.
11. Adicione 30 µl de RSB a cada poço de amostras da placa de PCF.
12. Pipete 10 vezes para misturar.
13. Aplique o selo autocolante da placa na placa de PCF e mantenha-a em gelo.
14. Volte a armazenar o EPH3, FSM, RVT e SSM.

15. Se estiver a processar amostras derivadas apenas de ARN (ADNc) e não parar no ponto de paragem segura, prossiga para [Executar reparação de extremidades e poliadenilação na página 54](#).

#### PONTO DE PARAGEM SEGURA

Se estiver a parar, centrifugue a placa PCF PCR a 280 × g durante 1 minuto e armazene entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 7 dias.

## Passos de preparação do protocolo

1. Retire os controlos de ADN do armazenamento.
2. Retire o tubo de reagente da caixa e siga as instruções de descongelação.

Tabela 16 Preparação de banco (Refrigerado) no TruSight Oncology Comp (PN 20031119)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelação	Passo do protocolo
TEB	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Fragmento de ADN genómico

## Fragmento de ADN genómico

Este processo fragmenta o ADN genómico e gera fragmentos de ADN bicatenário com saliências 3' ou 5'.

### Preparação

1. Certifique-se de que segue as recomendações em [Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28](#), para quantificar as amostras.
2. Prepare o seguinte reagente.
  - TEB — Inverta ou agite com o vórtex para misturar.

### Procedimento

#### Preparar a placa

1. Selecione uma das três opções seguintes para preparar a placa.
  - **Opção n.º 1:** Processe amostras de ADN genómico em simultâneo com amostras de ADNc na placa PCF MIDI.
    - a. Rotule a placa PCF MIDI LP (Preparação do banco).
    - b. Coloque em gelo e reserve para utilização na [Transferir o ADN fragmentado na página 52](#).
  - **Opção n.º 2:** Processe amostras de ADN genómico em simultâneo com amostras de ADNc, estando a placa PCF PCR congelada.
    - a. Descongele a placa PCF PCR à temperatura ambiente.
    - b. Centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.

- c. Pipete 10 vezes para misturar.
  - d. Rotule uma nova placa LP MIDI (Preparação do banco) de 96 poços.
  - e. Transfira os 50 µl de cada amostra da placa PCF PCR para o poço correspondente da placa LP MIDI.
  - f. Elimine a placa PCF PCR.
  - g. Aplique o selo autocolante da placa e coloque em gelo até [Transferir o ADN fragmentado na página 52](#).
- **Opção n.º 3:** Processe apenas amostras de ADN genómico.
    - a. Rotule uma nova placa LP MIDI (Preparação do banco) de 96 poços.
    - b. Se estiver a parar no [PONTO DE PARAGEM SEGURA na página 53](#), utilize uma placa PCR.
    - c. Cubra e reserve para utilização na [Transferir o ADN fragmentado na página 52](#).

## Diluir o ADN genómico

1. Descongele as amostras de ADN genómico e os controlos de ADN à temperatura ambiente.
2. Pipete cada amostra de ADN genómico 10 vezes para misturar.
3. Centrifugue brevemente o tubo para colher gotículas.
4. Inverta ou agite com o vórtex o TEB para misturar.
5. Utilize o TEB para preparar cada amostra de ADN genómico, num volume final de 52 µl. Consulte a tabela seguinte para obter as quantidades de entrada e concentrações mínimas, com base no tipo de amostra. O ensaio requer uma concentração mínima de extração, para permitir, pelo menos, 40 µl de TEB do volume de 52 µl. Para controlos de ADN, utilize a concentração indicada no rótulo do tubo. Para evitar a perda da amostra, não pipete menos de 2 µl de amostra nesta diluição.

Tipo de amostra	Valor de entrada (ng)	Concentração mínima (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Controlo	40	Consulte o rótulo do tubo

## Fragmento

1. Adicione 52 µl de cada amostra de ADN genómico num poço separado do ultrassonicador.



### ATENÇÃO

Carregue o ADN genómico no tubo lentamente, certificando-se de que não existem espaços de ar no fundo do tubo. Para obter mais informações, consulte [Ensaio na página 31](#) e as instruções do fabricante.

2. Registe a orientação da régua.
3. Fragmento o ADN genómico em fragmentos com um ultrassonicador.

## Transferir o ADN fragmentado

1. Certifique-se de que o esquema da placa de amostras e os índices para cada amostra correspondem ao ensaio que selecionar para análise com o Módulo de análise do TSO Comprehensive (UE).
2. Siga as instruções do fabricante do ultrassonicador, para recuperar a amostra.  
Para alguns tipos de ultrassonicadores, pode ser necessária centrifugação para consolidar a amostra no tubo.
3. Para cada amostra de ADN genómico fragmentada, utilize uma pipeta p20 com pontas finas para realizar três transferências de 16,7 µl para um poço vazio da placa LP MIDI.
4. Aplique o selo autocolante da placa na placa LP MIDI.

#### PONTO DE PARAGEM SEGURA

Se estiver a parar, aplique o selo autocolante da placa na placa LP PCR e centrifugue a 280 × g durante 1 minuto. Conserve entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 7 dias.

## Passos de preparação do protocolo

Certifique-se de que os programas do termociclador pós-amplificação estão definidos. Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).

1. Prepare um balde de gelo.
2. Retire o tubo de reagente da caixa e siga as instruções de descongelação.

Tabela 17 Caixa de preparação de banco (Congelado) no TruSight Oncology Comp (PN 20031118)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelação	Passo do protocolo
ERA1-A	-25 °C a -15 °C	Mantenha em gelo.	Executar reparação de extremidades e poliadenilação
ERA1-B	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Executar reparação de extremidades e poliadenilação
ALB1	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Adaptadores de ligação
LIG3	-25 °C a -15 °C	Mantenha em gelo.	Adaptadores de ligação
SUA1 (tampa azul)	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Adaptadores de ligação
UMI (tampa branca)	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Adaptadores de ligação
STL	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Adaptadores de ligação
EPM	-25 °C a -15 °C	Mantenha em gelo.	PCR de índice

Tabela 18 Caixa de preparação de banco (Refrigerado) no TruSight Oncology Comp (PN 20031119)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
SPB (etiqueta verde clara)	2 °C a 8 °C	Coloque à temperatura ambiente durante 30 minutos.	Limpar ligação
RSB	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Limpar ligação

Tabela 19 Caixa de primers de indexação UP TruSight Oncology Comp (PN 20031120)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
UPxx	-25 °C a -15 °C	Descongele os tubos de primers de indexação adequados à temperatura ambiente.	PCR de índice

Tabela 20 Caixa de primers de indexação CP TruSight Oncology Comp (PN 20031126)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
CPxx	-25 °C a -15 °C	Descongele os tubos de primers de indexação adequados à temperatura ambiente.	PCR de índice

## Executar reparação de extremidades e poliadenilação

Este processo repara as saliências resultantes da fragmentação em extremidades com cauda poliadenilada saliente utilizando uma mistura principal de poliadenilação de reparação de extremidades (ERA1).

A atividade de exonuclease 3' a 5' desta mistura remove as saliências 3' e a atividade de polimerase 5' a 3' preenche as saliências 5'. As extremidades 3' são poliadeniladas durante esta reação, para evitar que se liguem umas às outras, durante a reação de ligação do adaptador.

### Preparação

1. Pré-aqueça 2 incubadoras de microamostras com inserções de blocos de aquecimento MIDI, da seguinte forma.
  - Pré-aqueça uma incubadora de microamostras a 30 °C.
  - Pré-aqueça uma incubadora de microamostras a 72 °C.
2. Prepare os seguintes reagentes.
  - ERA1-A — Centrifugue brevemente e, em seguida, pipete para misturar. Mantenha em gelo.
  - ERA1-B — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente. Inspeione para verificar se existem precipitados. Se presente, aqueça o tubo a 37 °C e, em seguida, pipete para misturar até os precipitados se dissolverem.
3. Prepare a mistura principal ERA1 num tubo de microcentrifugação.

Tabela 21 Mistura principal ERA1

Componente de mistura principal	4 bancos	8 bancos	16 bancos	24 bancos	48 bancos
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

<sup>1</sup> Esta tabela inclui excesso de volume. Consulte [Manuseamento de reagentes na página 35](#) para cálculos.

- Pipete lentamente 10 vezes para garantir a homogeneidade, centrifugue brevemente e, em seguida, coloque a mistura principal ERA1 em gelo.
- Selecione a opção adequada das duas opções seguintes, para preparar a placa.
  - Opção n.º 1:** Se as amostras estiverem numa placa MIDI:
    - Volte a etiquetar a placa LP2 MIDI (Preparação do banco 2).

Se algumas amostras estiverem em placas MIDI separadas, mova todas as amostras para poços separados da mesma placa MIDI, de acordo com o esquema da placa.

- Opção n.º 2:** Se a placa estiver congelada:
  - Descongele a placa PCF PCR ou a placa LP PCR à temperatura ambiente.
  - Centrifugue a placa a 280 × g durante 1 minuto.
  - Pipete 10 vezes para misturar.
  - Rotule uma nova placa LP2 MIDI de 96 poços (Preparação do banco 2).
  - Transfira os 50 µl de cada amostra da placa PCF PCR ou da placa LP PCR para o poço correspondente da placa LP2 MIDI.
  - Elimine a placa PCF PCR ou PCR LP.

## Procedimento

- Adicione 10 µl de mistura principal ERA1 a cada poço de amostras na placa LP2 MIDI.
- Elimine a restante mistura principal ERA1.
- Aplique o selo autocolante da placa na placa LP2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
- Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
- Incube na incubadora de microamostras pré-aquecida a 30 °C durante 30 minutos.
- Transfira imediatamente para uma segunda incubadora de microamostras pré-aquecida e incube a 72 °C durante 20 minutos.
- Coloque a placa LP2 MIDI em gelo durante 5 minutos.

## Adaptadores de ligação

Este processo liga adaptadores às extremidades dos fragmentos de ADNc e/ou ADN genómico.

O ensaio TSO Comprehensive (UE) inclui adaptadores SUA1 e UMI.

- Utilize adaptadores SUA1 com amostras de ARN.
- Utilize adaptadores UMI com amostras de ADN.

## Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes.
  - ALB1 — Agite com o vórtex para misturar durante, pelo menos, 10 segundos e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - LIG3 — Centrifugue brevemente e, em seguida, pipete para misturar. Mantenha em gelo.
  - SUA1 — Agite com o vórtex para misturar durante, pelo menos, 10 segundos e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - UMI — Agite com o vórtex para misturar durante, pelo menos, 10 segundos e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - STL — Ponha de lado para utilização no procedimento.

## Procedimento

1. Retire a placa LP2 MIDI do gelo.
2. Adicione 60 µl de ALB1 a cada poço de amostra da placa LP2 MIDI. ALB1 é uma solução viscosa; minimize a formação de bolhas durante a pipetagem.
3. Adicione 5 µl de LIG3 a cada poço de amostras.
4. Adicione adaptadores.  
*Não combine diferentes tipos de adaptadores.*
  - **Poços para amostras de ARN** — 10 µl de SUA1 (tampa azul) para cada amostra derivada de ARN.
  - **Poços para amostras de ADN** — 10 µl de UMI (tampa branca) para cada amostra derivada de ADN.
5. Aplique o selo autocolante da placa na placa LP2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
6. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
7. Incube à temperatura ambiente durante 30 minutos.
8. Agite com o vórtex o STL para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
9. Adicione 5 µl de STL a cada poço de amostras da placa LP2 MIDI.
10. Aplique o selo autocolante da placa na placa LP2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
11. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.



## Limpar ligação

Este processo utiliza as SPB para purificar os fragmentos de ADNc ou ADN genómico ligados ao adaptador e remove produtos indesejados. As esférulas são lavadas duas vezes com etanol novo a 80%. As amostras ligadas ao adaptador são eluídas com RSB.

### Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes.
  - SPB — Certifique-se de que as esférulas estão à temperatura ambiente, durante 30 minutos.
  - RSB — Ponha de lado para utilização no procedimento.
2. Prepare EtOH novo a 80% num tubo cónico de 15 ml ou 50 ml.

Tabela 22 Prepare etanol novo a 80%

Reagente	4 bancos	8 bancos	16 bancos	24 bancos	48 bancos
100% Ethanol alcohol, puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Agite com o vórtex o EtOH novo a 80% para misturar.
4. Instale o íman.

### Procedimento

#### Ligue

1. Agite com o vórtex as SPB durante 1 minuto, para ressuspender as esférulas.
2. Adicione imediatamente 112 µl de SPB a cada poço de amostras da placa LP2 MIDI.  
Se utilizar uma cuba para dispensar as SPB, inclua um fator de excesso de 1,05 ao obter alíquotas de material suficiente por amostra. Elimine qualquer material restante depois de as SPB terem sido adicionadas a cada poço de amostras.
3. Aplique o selo autocolante da placa na placa LP2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
4. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
5. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. Coloque a placa LP2 MIDI num suporte magnético durante 10 minutos.
7. Utilize um conjunto de pipetas P200 definidas para 200 µl, para remover e eliminar todo o sobrenadante de cada poço de amostras sem perturbar os pellets de esférulas.

## Lavagem

1. Lave as esférulas da seguinte forma.
  - a. Mantenha em suporte magnético e adicione 200 µl de EtOH novo a 80% a cada poço de amostras.
  - b. Aguarde 30 segundos.
  - c. Remova e elimine todo o sobrenadante de cada poço, sem perturbar o pellet de esférulas.
2. Lave as esférulas uma *segunda* vez.
3. Remova o EtOH residual de cada poço.  
Utilize uma pipeta P20 com pontas finas.
4. Elimine o EtOH a 80% não utilizado.

## Eluir

1. Retire a placa LP2 MIDI do suporte magnético.
2. Inverta ou agite com o vórtex o RSB para misturar.
3. Adicione 27,5 µl de RSB a cada poço de amostras.
4. Aplique o selo autocolante da placa na placa LP2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
5. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
6. Incube à temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
8. Rotule uma nova placa PCR de LS (amostras do banco) de 96 poços.
9. Transfira 25 µl de cada eluato da placa LP2 MIDI para o poço correspondente da placa PCR de LS.
10. Elimine a placa LP2 MIDI vazia.

## PCR de índice

Neste passo, os fragmentos do banco são amplificados utilizando primers que adicionam sequências de índice para multiplexagem de amostras. O produto resultante contém o banco completo de fragmentos de ADNc e/ou ADN flanqueados por adaptadores necessários para a produção de clusters.

## Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes.
  - EPM — Mantenha no gelo.
  - UPxx — Agite com o vórtex para misturar e centrifugue brevemente. UPxx é o primer de índice selecionado no ecrã Create Run (Criar ensaio) no software Local Run Manager, durante a configuração do ensaio.

- CPxx — Agite com o vórtex para misturar e centrifugue brevemente. CPxx é o primer de índice selecionado no ecrã Create Run (Criar ensaio) no software Local Run Manager, durante a configuração do ensaio.
2. Certifique-se de que os índices para cada amostra correspondem ao ensaio planeado no Módulo de análise do TSO Comprehensive (UE), durante a configuração do ensaio. Certifique-se de que segue as instruções relativas à seleção do índice em [Número de bancos e seleção de índices na página 38](#).

**ATENÇÃO**

As divergências entre as amostras e os primers de indexação resultam na comunicação incorreta de resultados, devido à perda da identificação positiva da amostra.

**Procedimento**

1. Adicione 5 µl do primer de indexação adequado (UPxx ou CPxx) ao poço de amostra correspondente na placa PCR de LS, de acordo com os índices selecionados.

**ATENÇÃO**

Manuseie e abra apenas um tubo de primer de indexação de cada vez. Volte a tapar cada tubo para indexação com uma nova tampa, imediatamente após a utilização. Não combine primers de indexação.

2. Agite com o vórtex o EPM para misturar durante 5 segundos e, em seguida, centrifugue brevemente.
3. Adicione 20 µl de EPM a cada poço de amostras.
4. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR de LS.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
5. Agite a 1200 rpm durante 1 minuto.
6. Volte a armazenar os reagentes de pré-amplificação.

**ATENÇÃO**

Execute todos os passos subsequentes numa área de pós-amplificação, para evitar a contaminação cruzada do produto de amplificação.

7. Centrifugue a placa PCR de LS a 280 × g durante 1 minuto.
8. Coloque no termociclador pós-amplificação pré-programado e execute o programa I-PCR.  
Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).

**NOTA** Se continuar com a [Configuração da primeira hibridação na página 60](#), siga as instruções de descongelação dos reagentes nos Passos de preparação do protocolo.

9. Após a conclusão do programa de I-PCR, centrifugue a placa PCR de LS a 280 × g durante 1 minuto.
10. Volte a etiquetar a placa ALS (Amostras de banco amplificadas).

**PONTO DE PARAGEM SEGURA**

Se parar, armazene a placa PCR para ALS entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 30 dias.

**Passos de preparação do protocolo**

1. Certifique-se de que os programas do termociclador pós-amplificação estão definidos. Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).
2. Retire o tubo de reagente da caixa e siga as instruções de descongelamento.

Tabela 23 Caixa de enriquecimento (Refrigerado) TruSight Oncology Comp (PN 20031123)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
TCB1	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Configuração da primeira hibridação

Tabela 24 Caixa de enriquecimento (Congelado) TruSight Oncology Comp (PN 20031121)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
TCA1	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Configuração da primeira hibridação

Tabela 25 Caixa de conjunto de conteúdos TruSight Oncology Comp (PN 20031122)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
OPR1 (tampa vermelha)	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Configuração da primeira hibridação
OPD2 (tampa branca)	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Configuração da primeira hibridação

**Configuração da primeira hibridação**

Durante este processo, um pool de oligonucleótidos hibrida-se com bancos de ADNc e um pool de oligonucleótidos hibrida-se com bancos de ADN genómico preparados em [PCR de índice na página 58](#). O enriquecimento das regiões visadas requer dois passos de hibridação. Na primeira hibridação, os oligonucleótidos hibridam-se em bancos de ADNc e/ou ADN genómico, durante a noite (8 horas a 24 horas).

**Preparação**

1. Prepare os seguintes reagentes.
  - TCB1 — Aquecer o tubo a 37 °C durante 5 minutos. Agite com o vórtex para misturar durante 10 segundos e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - TCA1 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

- OPR1 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - OPD2 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
2. Se a placa PCR para ALS tiver sido armazenada, descongele à temperatura ambiente e centrifugue a 280 × g durante 1 minuto. Em seguida, pipete para misturar.
  3. Rotule uma nova placa PCR de HYB1 (Hibridação 1) de 96 poços.

## Procedimento

1. Transfira 20 µl de cada banco de ADNc e/ou ADN genómico da placa PCR para ALS para o poço correspondente na placa PCR de HYB1.
2. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR para ALS e reserve.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
3. Inspeccione o TCB1 para verificar se existem precipitados. Se estiver presente, aqueça novamente o tubo e agite-o com o vórtex até os cristais se dissolverem.
4. Adicione 15 µl de TCB1 a cada poço de bancos na placa PCR de HYB1.
5. Adicione 10 µl de TCA1 a cada poço de bancos na placa PCR de HYB1.
6. Adicione sondas.  
*Não* combine diferentes tipos de sondas. Adicione apenas um conjunto de sondas por poço.
  - Poços do banco de ARN — 5 µl de OPR1 (tampa vermelha) para cada banco derivado de ARN.
  - DNA TSO Comprehensive (UE) library wells (Poços do banco de ADN) — 5 µl de OPD2 (tampa branca) para cada banco derivado de ADN para enriquecimento TSO Comprehensive (UE).
7. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR de HYB1.



### ATENÇÃO

Certifique-se que sela completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.

8. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
9. Coloque no termociclador e execute o programa HYB1.  
Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).
10. Hibride a 57 °C durante um mínimo de 8 horas, até um máximo de 24 horas.
11. Volte a armazenar os reagentes de hibridação.
12. Armazene a placa PCR para ALS entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 30 dias.

## Passos de preparação do protocolo

1. No início do dia 2, retire o tubo de reagente da caixa e siga as instruções de descongelação.

Tabela 26 Caixa de enriquecimento (Refrigerado) TruSight Oncology Comp (PN 20031123)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
SMB (etiqueta azul escura)	2 °C a 8 °C	Coloque à temperatura ambiente durante 30 minutos.	Captar alvos um Captar alvos dois
ET2	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Captar alvos um Captar alvos dois
HP3	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Captar alvos um Captar alvos dois Normalizar bancos
TCB1	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Configurar a segunda hibridação
RSB	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Captar alvos dois Limpar o banco de amplificação enriquecido

Tabela 27 Caixa de enriquecimento (Congelado) TruSight Oncology Comp (PN 20031121)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
EE2	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Captar alvos um Captar alvos dois Normalizar bancos
EEW	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Captar alvos um
TCA1	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Configurar a segunda hibridação

Tabela 28 Ensaio Caixa de configuração de conteúdo (PN 20031122)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
OPR1 (tampa vermelha)	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Configurar a segunda hibridação
OPD2 (tampa branca)	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Configurar a segunda hibridação

## Captar alvos um

Este passo utiliza SMB para capturar sondas hibridadas nas regiões de interesse visadas. As esférulas são lavadas três vezes com EEW. Os bancos enriquecidos são eluídos utilizando uma nova mistura de eluição EE2 + HP3 e neutralizadas com ET2.

### Preparação

1. Pré-aqueça uma incubadora de microamostras com um bloco de aquecimento MIDI a 57 °C.
2. Prepare os seguintes reagentes.
  - EEW — Agite com o vórtex durante 1 minuto.
  - EE2 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - HP3 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - SMB — Certifique-se de que as esférulas estão à temperatura ambiente durante 30 minutos. Certifique-se de que utiliza as **SMB** e não o SPB neste procedimento.
  - ET2 — Ponha de lado para utilização no procedimento.
3. Prepare uma nova mistura de eluição EE2 + HP3 num tubo de microcentrifugação.

Tabela 29 Mistura de eluição EE2 + HP3 para Captar alvos Um

Componente de mistura de eluição	4 bancos	8 bancos	16 bancos	24 bancos	48 bancos
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Esta tabela inclui excesso de volume. Consulte [Manuseamento de reagentes na página 35](#) para cálculos.

4. Agite com o vórtex a mistura da eluição EE2 + HP3 e, em seguida, centrifugue brevemente. Reserve para a etapa de [Eluir na página 65](#).
5. Rotule uma nova placa MIDI CAP1 (Captura 1) de 96 poços.
6. Instale o íman.

### Procedimento

#### Ligue

1. Retire a placa PCR de HYB1 do termociclador.
2. Centrifugue a placa PCR de HYB1 a 280 × g durante 1 minuto.
3. Agite com o vórtex SMB durante 1 minuto para ressuspender as esférulas.
4. Adicione imediatamente 150 µl de SMB a cada poço de bancos da placa CAP1 MIDI.

Se utilizar uma cuba para dispensar SMB, inclua um fator de excesso de 1,15 ao obter alíquotas de material suficiente por amostra. Elimine qualquer material restante depois de o SMB ter sido adicionado a cada poço de amostra.

5. Defina a pipeta para 50 µl e transfira o volume total de cada banco da placa PCR de HYB1 para o poço correspondente na placa CAP1 MIDI.
6. Elimine a placa PCR de HYB1 vazia.
7. Aplique o selo autocolante da placa na placa CAP1 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
8. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
9. Incube na incubadora de microamostras pré-aquecida a 57 °C durante 25 minutos.
10. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
11. Mantendo a placa CAP1 MIDI no suporte magnético, utilize uma pipeta P200 µl definida para 200 µl para remover e eliminar todo o sobrenadante, sem perturbar o pellet de esférulas.



### ATENÇÃO

Prossiga imediatamente para o passo seguinte ([Lavagem na página 65](#)). Não deixe o pellet de esférulas repousar durante um período de tempo prolongado, sem a presença de líquido.



## Lavagem

1. Lave as esférulas da seguinte forma.
  - a. Retire a placa CAP1 MIDI do suporte magnético.
  - b. Adicione 200 µl de EEW a cada poço.
  - c. Defina o volume da pipeta para 150 µl e pipete para misturar, no mínimo, 10 vezes. Certifique-se de que todas as esférulas são ressuspensas.



### ATENÇÃO

Certifique-se de que não existem pellets de esférulas, aspirando cuidadosamente a solução total de esférulas do poço para a ponta. Em seguida, observe o fundo de cada poço para ver se existe um pellet. Ajuste o ângulo da ponta da pipeta em direção ao pellet de esférulas, durante os passos de lavagem para desalojar o pellet. Certifique-se de que o pellet de esférulas está totalmente na solução. A solução deve ter uma aparência castanha escura e uma consistência homogênea.

- d. Aplique o selo autocolante da placa na placa CAP1 MIDI.
  - e. Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
  - f. Agite a 1800 rpm durante 4 minutos.
  - g. Incube numa incubadora de microamostras a 57 °C durante 5 minutos.
  - h. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
  - i. Mantenha no suporte magnético e remova e elimine todo o sobrenadante de cada poço, sem perturbar o pellet de esférulas.
2. Lave as esférulas uma *segunda* vez.
  3. Lave as esférulas uma *terceira* vez.
  4. Remova o sobrenadante residual de cada poço.  
Utilize uma pipeta P20 com pontas finas.

## Eluir

1. Retire a placa CAP1 MIDI do suporte magnético.
2. Agite com o vórtex nova mistura de eluição EE2 + HP3 e, em seguida, centrifugue brevemente.
3. Adicione cuidadosamente 17 µl de mistura de eluição EE2 + HP3 a cada poço de bancos na placa CAP1 MIDI.
4. Elimine a restante mistura de eluição EE2 + HP3.
5. Aplique o selo autocolante da placa na placa CAP1 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
6. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
8. Rotule uma nova placa PCR de 96 poços ELU1 (Eluição 1).

9. Agite com o vórtex o ET2 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
10. Adicione 5 µl de ET2 a cada poço de bancos correspondente na nova placa PCR ELU1.
11. Transfira cuidadosamente 15 µl de eluato de cada poço de bancos da placa CAP1 MIDI para o poço correspondente da placa PCR ELU1.
12. Elimine a placa CAP1 MIDI vazia.
13. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR ELU1.
14. Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
15. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
16. Volte a colocar o EEW no armazenamento.

## Configurar a segunda hibridação

Este passo liga regiões-alvo dos bancos de ADNc e/ou ADN genómico enriquecidos com sondas de captura uma segunda vez. A segunda hibridação garante uma elevada especificidade das regiões captadas. Para garantir um enriquecimento ideal dos bancos, realize o segundo passo de hibridação a 57 °C durante um mínimo de 1,5 horas até um máximo de 4 horas.

### Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes.
  - TCB1 — Aquecer o tubo a 37 °C durante 5 minutos. Agite com o vórtex para misturar durante 10 segundos e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - TCA1 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - OPR1 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - OPD2 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

### Procedimento

1. Inspeccione o TCB1 para verificar se existem precipitados. Se estiver presente, aqueça novamente o tubo e agite-o com o vórtex até os cristais se dissolverem.
2. Adicione 15 µl de TCB1 a cada poço de bancos na placa PCR ELU1.
3. Adicione 10 µl de TCA1 a cada poço de bancos.
4. Adicione sondas.

*Não* combine diferentes tipos de sondas.

  - Poços do banco de ARN — 5 µl de OPR1 (tampa vermelha) para cada banco derivado de ARN.
  - DNA TSO Comprehensive (UE) library wells (Poços do banco de ADN) — 5 µl de OPD2 (tampa branca) para cada banco derivado de ADN para enriquecimento TSO Comprehensive (UE).
5. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR ELU1.

Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.

6. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque num termociclador e execute o programa HYB2.  
Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).
8. Hibride a 57 °C durante um mínimo de 1,5 horas, até um máximo de 4 horas.
9. Volte a armazenar os reagentes de hibridação.

## Captar alvos dois

Este passo utiliza SMB para capturar sondas hibridadas nas regiões de interesse visadas. As esférulas são lavadas uma vez com RSB. Os bancos enriquecidos são eluídos utilizando uma nova mistura de eluição EE2 + HP3 e neutralizadas com ET2.

### Preparação

1. Pré-aqueça uma incubadora de microamostras com bloco de aquecimento MIDI a 57 °C.
2. Prepare os seguintes reagentes.
  - EE2 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - HP3 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - SMB — Certifique-se de que as esférulas estão à temperatura ambiente durante 30 minutos. Certifique-se de que utiliza as **SMB** e não o SPB neste procedimento.
  - RSB — Ponha de lado para utilização no procedimento.
  - ET2 — Ponha de lado para utilização no procedimento.
3. Prepare uma nova mistura de eluição EE2 + HP3 num tubo de microcentrifugação.

Tabela 30 Mistura de eluição EE2 + HP3 para captar alvos dois

Componente de mistura de eluição	4 bancos	8 bancos	16 bancos	24 bancos	48 bancos
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Esta tabela inclui excesso de volume. Consulte [Manuseamento de reagentes na página 35](#) para cálculos.

4. Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente. Reserve para a etapa de [Eluir na página 69](#).
5. Rotule uma nova placa MIDI CAP2 (Captura 2) de 96 poços.
6. Instale o íman.

### Procedimento

#### Ligue

1. Retire a placa PCR ELU1 do termociclador.
2. Centrifugue a placa PCR ELU1 a 280 × g durante 1 minuto.
3. Agite com o vórtex SMB durante 1 minuto para ressuspender as esférulas.
4. Adicione imediatamente 150 µl de SMB a cada poço de bancos da placa CAP2 MIDI.  
Se utilizar uma cuba para dispensar SMB, inclua um fator de excesso de 1,15 ao obter alíquotas de material suficiente por amostra. Elimine qualquer material restante depois de o SMB ter sido adicionado a cada poço de amostra.
5. Defina a pipeta para 50 µl e transfira o volume total de cada banco da placa PCR ELU1 para o poço correspondente da placa CAP2 MIDI.
6. Elimine a placa PCR ELU1 vazia.
7. Aplique o selo autocolante da placa na placa CAP2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
8. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
9. Incube numa incubadora de microamostras a 57 °C durante 25 minutos.

**NOTA** Se continuar com [Banco de amplificação enriquecido na página 70](#), siga as instruções de descongelação para reagentes na secção Passos de preparação do protocolo.

10. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
11. Mantenha a placa CAP2 MIDI no suporte magnético e utilize uma pipeta P200 definida para 200 µl, para remover e eliminar todo o sobrenadante de cada poço de bancos, sem perturbar o pellet de esférulas.



## ATENÇÃO

Prossiga imediatamente para o passo seguinte ([Lavagem na página 68](#)). Não deixe o pellet de esférulas repousar durante um período de tempo prolongado, sem a presença de líquido.

## Lavagem

1. Retire a placa CAP2 MIDI do suporte magnético.
2. Inverta ou agite com o vórtex o RSB para misturar.
3. Adicione 200 µl de RSB a cada poço.
4. Aplique o selo autocolante da placa na placa CAP2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
5. Agite a 1800 rpm durante 4 minutos.
6. Seque no suporte magnético durante 2 minutos.
7. Mantenha a placa CAP2 MIDI no suporte magnético e remova e elimine todo o sobrenadante, sem perturbar o pellet de esférulas.
8. Remova o sobrenadante residual de cada poço.  
Utilize uma pipeta P20 com pontas finas.

## Eluir

1. Retire a placa CAP2 MIDI do suporte magnético.
2. Agite com o vórtex nova mistura de eluição EE2 + HP3 e, em seguida, centrifugue brevemente.
3. Adicione 22 µl de mistura de eluição EE2 + HP3 a cada poço de bancos na placa CAP2 MIDI.
4. Elimine a restante mistura de eluição EE2 + HP3.
5. Aplique o selo autocolante da placa na placa CAP2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
6. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
8. Rotule uma nova placa PCR de 96 poços ELU2 (Eluição 2).
9. Agite com o vórtex o ET2 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
10. Adicione 5 µl de ET2 a cada poço de bancos correspondente na nova placa ELU2 PCR.
11. Transfira cuidadosamente 20 µl de eluato de cada poço de bancos da placa CAP2 MIDI para o poço correspondente da placa ELU2 PCR.
12. Elimine a placa CAP2 MIDI vazia.
13. Aplique o selo autocolante da placa na placa ELU2 PCR.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
14. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
15. Volte a armazenar o SMB, EE2, HP3 e ET2.

### PONTO DE PARAGEM SEGURA

Se estiver a parar, centrifugue a placa ELU2 PCR a 280 × g durante 1 minuto e armazene entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 7 dias. Volte a colocar o RSB no armazenamento.

## Passos de preparação do protocolo

1. Prepare um balde de gelo.
2. Retire o tubo de reagente da caixa e siga as instruções de descongelação.

Tabela 31 Caixa de enriquecimento (Congelado) TruSight Oncology Comp (PN 20031121)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelação	Passo do protocolo
PPC3	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Banco de amplificação enriquecido
EPM	-25 °C a -15 °C	Mantenha em gelo.	Banco de amplificação enriquecido

Tabela 32 Caixa de enriquecimento (Refrigerado) TruSight Oncology Comp (PN 20031123)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelação	Passo do protocolo
SPB (etiqueta verde clara)	2 °C a 8 °C	Coloque à temperatura ambiente durante 30 minutos.	Limpar o banco de amplificação enriquecido
RSB	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Limpar o banco de amplificação enriquecido Preparar para sequenciação

## Banco de amplificação enriquecido

Este passo utiliza primers para o banco de amplificação enriquecido.

### Preparação

1. Se a placa ELU2 tiver sido armazenada, descongele à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto.

### Procedimento

1. Agite com o vórtex o PPC3 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
2. Adicione 5 µl de PPC3 a cada poço de bancos da placa ELU2 PCR.
3. Agite com o vórtex o EPM durante 5 segundos para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
4. Adicione 20 µl de EPM a cada poço de bancos.
5. Aplique o selo autocolante da placa na placa ELU2 PCR.  
Sele completamente as extremidades e os poços, para evitar a evaporação.
6. Agite a 1200 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque no termociclador e execute o programa EL-PCR.  
Consulte [Programar termocicladores na página 44](#).

**Nota** Se continuar com [Normalizar bancos na página 73](#), siga as instruções de descongelação na secção Passos de preparação do protocolo.

8. Volte a colocar o PPC3 e o EPM no armazenamento.

## Limpar o banco de amplificação enriquecido

Este passo utiliza as SPB para purificar os bancos enriquecidos, em relação a componentes de reação indesejada. As esférulas são lavadas duas vezes com etanol novo a 80%. As bancos são eluídos com RSB.

## Preparação

1. Prepare os seguintes reagentes.
  - SPB — Certifique-se de que as esférulas estão à temperatura ambiente, durante 30 minutos. Certifique-se de que utiliza as **SPB** e não o SMB neste procedimento.
  - RSB — Ponha de lado para utilização no procedimento.
2. Prepare etanol novo a 80% num tubo cónico de 15 ml ou 50 ml.

Tabela 33 Prepare etanol novo a 80%

Reagente	4 bancos	8 bancos	16 bancos	24 bancos	48 bancos
100% Ethanol, puro	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Agite com o vórtex o EtOH novo a 80% para misturar.
4. Rotule uma nova placa BIND2 MIDI de 96 poços (limpar ligação).
5. Instale o íman.

## Procedimento

### Ligue

1. Retire a placa ELU2 PCR do termociclador.
2. Centrifugue a placa ELU2 PCR a 280 × g durante 1 minuto.
3. Agite com o vórtex as SPB durante 1 minuto, para ressuspender as esférulas.
4. Adicione imediatamente 110 µl de SPB a cada poço de bancos da placa BIND2 MIDI.
5. Transfira 50 µl de cada banco da placa ELU2 PCR para o poço correspondente da placa BIND2 MIDI.
6. Elimine a placa ELU2 PCR vazia.
7. Aplique o selo autocolante da placa na placa BIND2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
8. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
9. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos.
10. Coloque a placa num suporte magnético durante 5 minutos.
11. Utilize um conjunto de pipetas P200 para 200 µl, para remover e eliminar *todo* o sobrenadante de cada poço de bancos, sem perturbar os pellets de esférulas.

## Lavagem

1. Lave as esférulas da seguinte forma.
  - a. Mantenha em suporte magnético e adicione 200 µl de EtOH novo a 80% a cada poço.
  - b. Aguarde 30 segundos.
  - c. Remova e elimine todo o sobrenadante de cada poço de amostras, sem perturbar os pellets de esférulas.
2. Lave as esférulas uma *segunda* vez.
3. Remova o EtOH residual de cada poço.  
Utilize uma pipeta P20 com pontas finas.
4. Elimine o EtOH a 80% não utilizado.

## Eluir

1. Retire a placa BIND2 MIDI do suporte magnético.
2. Inverta ou agite com o vórtex para misturar o RSB.
3. Adicione 32 µl de RSB a cada poço de bancos.
4. Aplique o selo autocolante da placa na placa BIND2 MIDI.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
5. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
6. Incube à temperatura ambiente durante 2 minutos.
7. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
8. Rotule uma nova placa PCR de PL (bancos purificados) de 96 poços.
9. Transfira 30 µl de cada eluato da placa BIND2 MIDI para o poço correspondente da placa PCR de PL.
10. Elimine a placa BIND2 MIDI vazia.
11. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR de PL.
12. Volte a colocar as SPB no armazenamento.

### PONTO DE PARAGEM SEGURA

Se estiver a parar, centrifugue a placa PCR de PL a 280 × g durante 1 minuto e armazene entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 30 dias. Volte a colocar o RSB no armazenamento.

## Passos de preparação do protocolo

1. Retire o tubo de reagente da caixa e siga as instruções de descongelação.



Tabela 34 Caixa de enriquecimento (Congelado) TruSight Oncology Comp (PN 20031121)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
LNA1	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Normalizar bancos
EE2	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente.	Normalizar bancos

Tabela 35 Caixa de enriquecimento (Refrigerado) TruSight Oncology Comp (PN 20031123)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
LNB1	2 °C a 8 °C	Coloque à temperatura ambiente durante 30 minutos.	Normalizar bancos
HP3	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Normalizar bancos Preparar para sequenciação
LNW1	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Normalizar bancos
LNS1	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Normalizar bancos

- Se continuar no mesmo dia com [Preparar para sequenciação na página 77](#), siga as instruções de descongelamento na secção Passos de preparação do protocolo.

## Normalizar bancos

Este processo utiliza LNB1 mais aditivos (LNA1) para normalizar a quantidade de cada banco, para garantir uma representação uniforme do banco nos bancos agrupados. As esférulas são lavadas duas vezes com LNW1. Os bancos são eluídos com uma nova mistura de eluição EE2 + HP3 e neutralizados com LNS1.

### Preparação

- Prepare os seguintes reagentes.
  - LNB1 — Certifique-se de que as esférulas estão à temperatura ambiente durante 30 minutos.
  - LNA1 — Agite com o vórtex para misturar.
  - EE2 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - HP3 — Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
  - LNW1 — Agite com o vórtex para misturar. Ponha de lado para utilização no procedimento.
  - LNS1 — Agite com o vórtex para misturar. Ponha de lado para utilização no procedimento.
- Agite com o vórtex o LNB1 durante 1 minuto para ressuspender as esférulas. Inverta o tubo LNB1 para se certificar de que todas as esférulas são ressuspensas.
- Utilizando um conjunto P1000 a 800 µl, pipete o LNB1 para cima e para baixo 10 vezes, para garantir a ressuspensão.

4. Prepare imediatamente uma nova Mistura Principal LNA1 + LNB1 num tubo cónico.

**ATENÇÃO**

Ressuspenda completamente o pellet de esférulas LNB1 no fundo do tubo, para evitar densidade de cluster inconsistente.

Tabela 36 Mistura principal LNA1 + LNB1

Componente de mistura principal	4 bancos	8 bancos	16 bancos	24 bancos	48 bancos
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Esta tabela inclui excesso de volume. Consulte [Manuseamento de reagentes na página 35](#) para cálculos.

5. Agite com o vórtex a mistura principal de LNA1 + LNB1. Reserve para o passo [Ligue na página 74](#).
6. Prepare uma nova mistura de eluição EE2 + HP3 num tubo de microcentrifugação.

Tabela 37 Mistura de eluição EE2 + HP3 para normalizar bancos

Componente de mistura de eluição	4 bancos	8 bancos	16 bancos	24 bancos	48 bancos
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Esta tabela inclui excesso de volume. Consulte [Manuseamento de reagentes na página 35](#) para cálculos.

7. Agite com o vórtex a mistura fresca da eluição e, em seguida, centrifugue brevemente. Reserve para a etapa de [Eluir na página 75](#).
8. Se a placa PCR de PL tiver sido armazenada, descongele à temperatura ambiente, centrifugue a 280 × g durante 1 minuto e, em seguida, pipete para misturar.
9. Rotule uma nova placa MIDI para BBN (normalização à base de esférulas) de 96 poços.
10. Instale o íman.

## Procedimento

### Ligue

1. Agite com o vórtex a mistura principal de LNA1 + LNB1.
2. Adicione imediatamente 45 µl de Mistura Principal LNA1 + LNB1 a cada poço de bancos da placa MIDI para BBN.
3. Elimine a mistura principal LNA1 + LNB1 restante.
4. Transfira 20 µl de cada banco da placa PCR de PL para o poço correspondente da placa MIDI para BBN.
5. Aplique o selo autocolante da placa na placa MIDI para BBN.  
Sele completamente as extremidades e os poços.

6. Agite a 1800 rpm durante 30 minutos.
7. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR de PL e volte a armazenar.
8. Coloque a placa num suporte magnético durante 2 minutos.
9. Mantenha num suporte magnético e utilize uma pipeta P200 para remover e eliminar todo o sobrenadante de cada poço, sem perturbar o pellet de esférulas.

## Lavagem

1. Lave as esférulas da seguinte forma.
  - a. Retire a placa MIDI para BBN do suporte magnético.
  - b. Adicione 45 µl de LNW1 a cada poço de bancos.
  - c. Aplique o selo autocolante da placa na placa MIDI para BBN.
  - d. Sele completamente as extremidades e os poços.
  - e. Agite a 1800 rpm durante 5 minutos.
  - f. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
  - g. Remova e elimine todo o sobrenadante de cada poço, sem perturbar o pellet de esférulas.
2. Lave as esférulas uma *segunda vez*.
3. Remova o sobrenadante residual de cada poço.  
Utilize uma pipeta P20 com pontas finas.

## Eluir

1. Retire a placa MIDI para BBN do suporte magnético.
2. Agite com o vórtex nova mistura de eluição EE2 + HP3 e, em seguida, centrifugue brevemente.
3. Adicione 32 µl de solução EE2 + HP3 a cada poço de bancos da placa MIDI para BBN.
4. Elimine a restante mistura de eluição.
5. Aplique o selo autocolante da placa na placa MIDI para BBN.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
6. Agite a 1800 rpm durante 2 minutos.
7. Coloque num suporte magnético durante 2 minutos.
8. Rotule uma nova placa PCR para NL (Bancos Normalizados) de 96 poços.
9. Transfira cuidadosamente 30 µl de eluato de cada poço de bancos da placa MIDI para BBN para o poço correspondente da placa PCR de NL.



### ATENÇÃO

Se as esférulas forem aspiradas para as pontas de pipeta, coloque as esférulas de volta na placa no suporte magnético e aguarde até que o líquido fique transparente (~2 minutos), antes de prosseguir para o passo seguinte do procedimento.

10. Elimine a placa MIDI para BBN vazia.
11. Agite com o vórtex o LNS1 para misturar.
12. Adicione 30 µl de LNS1 a cada poço de bancos na nova placa PCR de NL.
13. Pipete cinco vezes para misturar.
14. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR de NL.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
15. Volte a armazenar LNB1, LNA1, EE2, LNW1 e LNS1.

#### PONTO DE PARAGEM SEGURA

Se estiver a parar, centrifugue a placa PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto e armazene entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 30 dias.

## Passos de preparação do protocolo

Inicie a preparação de consumíveis de sequenciação a partir do NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (PN 20028871), pelo menos uma hora antes da utilização.

1. Retire o tampão de diluição de bancos (HT1) do armazenamento entre -25 °C e -15 °C, descongele à temperatura ambiente e, em seguida, coloque em gelo.
2. Siga as instruções de preparação no *Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)* para outros consumíveis no kit.
  - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
  - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
  - Cartucho de célula de fluxo de saída elevada NextSeq 550Dx v2.5 (300 ciclos)
3. Retire o tubo de reagente da caixa e siga as instruções de descongelamento.

Tabela 38 Caixa de enriquecimento (Congelado) TruSight Oncology Comp (PN 20031121)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
PhiX Internal Control (PX3 or PhiX)	-25 °C a -15 °C	Descongele à temperatura ambiente. Mantenha em gelo.	Preparar para sequenciação

Tabela 39 Caixa de enriquecimento (Refrigerado) TruSight Oncology Comp (PN 20031123)

Reagente	Armazenamento	Instruções de descongelamento	Passo do protocolo
HP3	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Preparar para sequenciação
RSB (etiqueta rosa)	2 °C a 8 °C	Leve à temperatura ambiente.	Preparar para sequenciação

## Preparar para sequenciação

### Preparação

1. Reveja as diretrizes para [Número de bancos e seleção de índices na página 38](#).
2. Rotule um tubo de microcentrifugação dHP3 (HP3 diluído).
3. Rotule um tubo de microcentrifugação dPhiX (PhiX diluído).
4. Pré-aqueça um bloco de aquecimento a 96 °C para tubos de microcentrifugação.
5. Prepare um balde de gelo.

### Controlo PhiX diluído e desnaturado

1. Agite com o vórtex o HP3 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
2. Combine os seguintes volumes no tubo dHP3 de microcentrifugação.
  - 10 µl HP3
  - 190 µl de água sem-RNase/DNase
3. Agite com o vórtex o dHP3 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
4. Inverta ou agite com o vórtex o RSB para misturar.
5. Agite com o vórtex o PhiX para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
6. Combine os seguintes volumes num tubo dPhiX de microcentrifugação.
  - 8 µl de RSB
  - 2 µl de controlo PhiX
7. Adicione 10 µl de dHP3 ao tubo dPhiX.
8. Elimine o tubo dHP3.
9. Agite com o vórtex o dPhiX para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
10. Incube o dPhiX à temperatura ambiente durante 5 minutos, para desnaturar.
11. Agite com o vórtex o HT1 para misturar.
12. Adicione imediatamente 980 µl de HT1 pré-refrigerado ao dPhiX.
13. Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
14. Coloque o dPhiX em gelo até à utilização na preparação para a segunda diluição.  
A concentração final é de 20 pM dPhiX.
15. Volte a armazenar o PhiX, o HP3 e o RSB.

### Bancos agrupados e desnaturados para TSO Comprehensive (UE)

1. Se a placa PCR de NL tiver sido armazenada, descongele à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugue a placa a 280 × g durante 1 minuto.
2. Utilizando uma pipeta multicanal de 30 µl, misture suavemente os bancos na placa PCR de NL cinco vezes.

Utilize pontas novas para cada banco.



## ATENÇÃO

Certifique-se de que mistura bem os poços de bancos para um desempenho ideal.

3. Selecione uma das seguintes opções para agrupar, desnaturar e diluir os bancos.
  - **Opção n.º 1:** Bancos de sequências derivados de amostras de ARN e de ADN, em simultâneo. Consulte [Opção n.º 1: Bancos de ADN e ARN em conjunto na página 78](#).
  - **Opção n.º 2:** Bancos de sequências derivados apenas de amostras de ADN. Consulte [Opção n.º 2: Bancos apenas de ADN na página 79](#).
  - **Opção n.º 3:** Bancos de sequências derivados apenas de amostras de ARN. Consulte [Opção n.º 3: Bancos apenas de ARN na página 80](#).

### Opção n.º 1: Bancos de ADN e ARN em conjunto

1. Rotule um tubo de microcentrifugação PRL (bancos de ARN agrupados).
2. Rotule um tubo de microcentrifugação PDL (bancos de ADN agrupados).
3. Transfira 10 µl de cada banco de ARN normalizado (ADNc) da placa NL para o tubo PRL. Não agrupe dois bancos com o mesmo primer de indexação.
4. Transfira 10 µl de cada banco de ADN normalizado da placa NL para o tubo PDL. Não agrupe dois bancos com o mesmo primer de indexação.
5. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR de NL. Sele completamente as extremidades e os poços.
6. Agite com o vórtex os tubos PRL e PDL para misturar.
7. Centrifugue brevemente os tubos PRL e PDL.
8. Incube os tubos PRL e PDL num bloco de aquecimento a 96 °C, durante 2 minutos.
9. Coloque o PRL e o PDL em gelo, durante 5 minutos.
10. Agite com o vórtex os tubos PRL e PDL para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
11. Volte a colocar os tubos PRL e PDL no gelo.

### Preparar a primeira diluição

1. Rotule um tubo de microcentrifugação DIL1 (Diluição 1).
2. Transfira 20 µl de PDL para o tubo DIL1 vazio.
3. Adicione 5 µl de PRL a DIL1.
4. Elimine os tubos PDL e PRL.
5. Adicione 475 µl de HT1 pré-refrigerado ao tubo DIL1 (diluição de 1:20).
6. Agite com o vórtex o tubo DIL1 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

## Preparar a segunda diluição

1. Rotule um tubo de microcentrifugação de 2,0 ml DIL2 (Diluição 2).
2. Transfira 40 µl de DIL1 para o tubo DIL2 vazio.
3. Elimine o tubo DIL1.
4. Adicione 1660 µl de HT1 pré-refrigerado ao tubo DIL2 (diluição de 1:850).
5. Agite com o vórtex o dPhiX 20 pM para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
6. Adicione 2,5 µl de dPhiX 20 pM preparados ao tubo DIL2.
7. Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
8. Carregue 1300 µl de DIL2 para o Cartucho de reagente de saída elevada NextSeq 550Dx descongelado v2 (300 ciclos).  
Para obter mais informações, consulte *Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)*.
9. Elimine o tubo DIL2.
10. Centrifugue a placa PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto e conserve entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 30 dias.
11. Avance para a sequenciação.  
Para obter mais informações, consulte *Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)*.

## Opção n.º 2: Bancos apenas de ADN

1. Rotule um tubo de microcentrifugação PDL com tampa de rosca (Bancos de ADN agrupados).
2. Transfira 10 µl de cada banco de ADN normalizado da placa NL para o tubo PDL.  
Não agrupe dois bancos com o mesmo primer de indexação.
3. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR de NL.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
4. Aplique o Microseal "B" à placa PCR de NL.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
5. Agite com o vórtex o tubo PDL para misturar.
6. Centrifugue brevemente o tubo PDL.
7. Incube o tubo PDL num bloco de aquecimento a 96 °C, durante 2 minutos.
8. Coloque o tubo PDL em gelo, durante 5 minutos.
9. Agite com o vórtex o tubo PDL para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
10. Volte a colocar o tubo PDL no gelo.

### Preparar a primeira diluição

1. Rotule um tubo de microcentrifugação DIL1 (Diluição 1).
2. Transfira 10 µl de PDL para o tubo DIL1 vazio.
3. Elimine o tubo PDL.
4. Adicione 190 µl de HT1 pré-refrigerado ao tubo DIL1 (diluição de 1:20).
5. Agite com o vórtex o DIL1 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

### Preparar a segunda diluição

1. Rotule um tubo de microcentrifugação de 2,0 ml DIL2 (Diluição 2).
2. Transfira 40 µl de DIL1 para o tubo DIL2 vazio.
3. Elimine o tubo DIL1.
4. Adicione 1660 µl de HT1 pré-refrigerado ao tubo DIL2 (diluição de 1:850).
5. Agite com o vórtex o dPhiX 20 pM e, em seguida, centrifugue brevemente.
6. Adicione 2,5 µl de dPhiX 20 pM preparados ao tubo DIL2.
7. Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
8. Carregue 1300 µl de DIL2 para o Cartucho de reagente de saída elevada NextSeq 550Dx descongelado v2 (300 ciclos).  
Para obter mais informações, consulte *Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)*.
9. Elimine o tubo DIL2.
10. Centrifugue a placa PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto e, em seguida, armazene entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 30 dias.
11. Avance para a sequenciação.  
Para obter mais informações, consulte *Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)*.

### Opção n.º 3: Bancos apenas de ARN

1. Rotule um tubo de microcentrifugação PRL (bancos de ARN agrupados).
2. Transfira 10 µl de cada banco de ARN normalizado (ADNc) da placa NL para o tubo PRL.  
Não agrupe dois bancos com o mesmo primer de indexação.
3. Aplique o selo autocolante da placa na placa PCR de NL.  
Sele completamente as extremidades e os poços.
4. Agite com o vórtex o tubo PRL para misturar.
5. Centrifugue brevemente o tubo PRL.
6. Incube o tubo PRL num bloco de aquecimento a 96 °C, durante 2 minutos.



7. Coloque o tubo PRL em gelo, durante 5 minutos.
8. Agite com o vórtex o tubo PRL para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
9. Volte a colocar o tubo PRL no gelo.

### Preparar a primeira diluição

1. Rotule um tubo de microcentrifugação DIL1 (Diluição 1).
2. Transfira 10 µl de PRL para o tubo DIL1 vazio.
3. Elimine o tubo PRL.
4. Adicione 190 µl de HT1 pré-refrigerado ao tubo DIL1 (diluição de 1:20).
5. Agite com o vórtex o DIL1 para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.

### Preparar a segunda diluição

1. Rotule um tubo de microcentrifugação de 2,0 ml DIL2 (Diluição 2).
2. Transfira 40 µl de DIL1 para o tubo DIL2 vazio.
3. Elimine o tubo DIL1.
4. Adicione 1646 µl de HT1 pré-refrigerado ao tubo DIL2 (diluição de 1:843).
5. Agite com o vórtex o dPhiX 20 pM e, em seguida, centrifugue brevemente.
6. Adicione 16,7 µl de dPhiX 20 pM preparados ao tubo DIL2.
7. Agite com o vórtex para misturar e, em seguida, centrifugue brevemente.
8. Carregue 1300 µl de DIL2 para o Cartucho de reagente de saída elevada NextSeq 550Dx descongelado v2 (300 ciclos).  
Para obter mais informações, consulte *Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)*.
9. Elimine o tubo DIL2.
10. Centrifugue a placa PCR de NL a 280 × g durante 1 minuto e conserve entre -25 °C e -15 °C por um período máximo de 30 dias.
11. Avance para a sequenciação.  
Para obter mais informações, consulte *Manual de referência do instrumento NextSeq 550Dx (documento n.º 1000000009513)*.

# Interpretação dos resultados

Os resultados de sequenciação do ensaio TSO Comprehensive (UE) são apresentados individualmente para cada amostra num relatório PDF e num relatório JSON. Também é gerado um relatório de baixa profundidade (`LowDepthReport.tsv`) ao nível da amostra.

Ao nível do ensaio, são gerados os seguintes ficheiros de saída:

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

Apenas as variantes que passam o controlo de qualidade aparecem nos relatórios PDF e JSON.

Para obter informações detalhadas sobre a análise, consulte Manual do fluxo de trabalho do módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (documento n.º 200008661).

## Resultados de diagnósticos complementares

Para cada utilização prevista de diagnóstico complementar (CDx), existem três resultados possíveis:

- **Positive** (Positivo) — Uma variante é detetada e classificada como nível 1 (CDx).
- **Not detected** (Não detetado) — Não são detetadas variantes ou biomarcadores associados à utilização prevista de CDx na amostra. O tipo de tumor selecionado para a amostra é adequado para o CDx.
- **No result** (Nenhum resultado) — Não é possível determinar o estado de uma variante por um ou mais dos seguintes motivos:
  - A utilização prevista de CDx não foi aplicável à amostra testada, porque o tipo de tumor selecionado para a amostra não é apropriado para o tipo de tumor de CDx.
  - O ensaio de sequenciação falhou nas especificações de controlo de qualidade.
  - O banco falhou nas especificações de controlo de qualidade necessárias.
  - O ácido nucleico adequado não foi executado.

Todos os resultados da utilização prevista de CDx são apresentados na secção Resultados de diagnósticos complementares do relatório JSON. Apenas as utilizações previstas com um resultado positivo são listadas na secção Resultados de diagnósticos complementares do relatório em PDF.

## Variante de perfil tumoral

O TSO Comprehensive (UE) foi concebido para comunicar variantes somáticas ao comunicar variantes com evidências de significância clínica ou variantes com potencial significância clínica. O software do ensaio TSO Comprehensive (UE) utiliza uma KB que determina se cada variante detetada e elegível ([Tabela 2](#)) é clinicamente significativa ou potencialmente clinicamente significativa, com base em evidências de

associações terapêuticas, diagnósticas ou prognósticas. A KB também leva em consideração se as associações são estabelecidas (ou não) no tipo de tumor testado. As associações de suscetibilidade ou risco de cancro não estão incluídas na KB. Polimorfismos comuns são removidos.

Para variantes de perfil tumoral, os resultados positivos são classificados em conclusões genómicas com evidência de significância clínica ou conclusões genómicas com potencial significância clínica, de acordo com a KB instalada e o tipo de tumor identificado.

As falhas do controlo de qualidade não levam a resultados para os tipos de variantes que são relevantes para os indicadores de controlo de qualidade falhados. Consulte o [Tabela 40](#) e o [Tabela 41](#) para obter mais informações. As posições de perfil tumoral com profundidade insuficiente são listadas no relatório de baixa profundidade e não no relatório TSO Comprehensive (UE).

## Controlo de qualidade

- Para obter informações sobre a quantificação de ácidos nucleicos e os requisitos mínimos de material de entrada, consulte [Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28](#).
- O ensaio de sequenciação e a validade da amostra são determinados automaticamente e comunicados pelo Módulo de análise do TSO Comprehensive (UE). Para obter informações detalhadas sobre a análise, consulte Manual do fluxo de trabalho do módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (documento n.º 200008661).

Tabela 40 TSO Comprehensive (UE) Indicadores de CQ de resultados do relatório

Tipo de saída	Indicador	Especificação	Descrição	Impacto da falha de especificação*
Ensaio de sequenciação	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Percentagem de leituras que passam no filtro (PF).	Ensaio de sequenciação invalidado, não foram apresentados resultados para qualquer amostra no ensaio.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Percentagem média de identificações de bases com pontuação de qualidade de Q30 ou superior para a Leitura 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Percentagem média de identificações de bases com pontuação de qualidade de Q30 ou superior para a Leitura 2.	

Tipo de saída	Indicador	Especificação	Descrição	Impacto da falha de especificação*
Bancos de ADN	CONTAMINATION_SCORE	$\leq 3106$ OU $> 3106$ e $P\_VALUE \leq 0,049$	<p>Um indicador que avalia a probabilidade de contaminação utilizando o VAF de variantes comuns. A pontuação de contaminação baseia-se na distribuição de VAF de SNP.</p> <p>O valor de P de contaminação utilizado para avaliar genomas altamente reorganizados, apenas aplicável quando a pontuação de contaminação está acima do Limite Superior de Especificações.</p>	Não foram comunicados resultados de ADN.

Tipo de saída	Indicador	Especificação	Descrição	Impacto da falha de especificação*
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	$\geq 70$	O comprimento médio do fragmento na amostra.	Não foram comunicados resultados de TMB ou variantes pequenas de ADN.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (contagem)	$\geq 150$	Média da cobertura de fragmentos de exões em todas as bases de exões.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Percentagem de bases de exões com cobertura de fragmentos de 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (contagem)	$\geq 40$	O número de centros MSI utilizáveis para identificações MSI (número de centros microsatélites com leituras de amplitude suficientes para identificar instabilidade de microsatélites).	Não foram comunicados resultados de MSI.
	COVERAGE_MAD (contagem)	$\leq 0,210$	A média de desvios absolutos da média da contagem normalizada de cada região-alvo de CNV.	Não foram comunicados resultados de amplificação genética.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (contagem)	$\geq 1,0$	A contagem média de recipientes em bruto por CNV-alvo.	

Tipo de saída	Indicador	Especificação	Descrição	Impacto da falha de especificação*
Bancos de ARN	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	$\geq 80,0$	O comprimento médio do fragmento na amostra.	Não foram comunicados resultados de fusões ou variantes de união exão-intrão.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (coeficiente)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X é um indicador de uniformidade de cobertura. Para cada gene com cobertura de pelo menos 500x, é calculado o coeficiente de variação na cobertura em todo o corpo do gene. Este indicador é a média destes valores. Um valor alto indica um nível alto de variação e indica um problema na preparação do banco, como problemas de entrada de amostra baixa e/ou de pulldown da sonda. Este indicador é calculado utilizando todas as leituras (incluindo leituras marcadas como duplicadas).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (contagem)	$\geq 9.000.000$	O número total de leituras que mapeiam para as regiões-alvo. Este indicador é calculado utilizando todas as leituras (incluindo leituras marcadas como duplicadas).	

\*Os resultados bem-sucedidos mostram PASS (Passou).

Tabela 41 TSO Comprehensive (UE) Indicadores de controlo de resultados do relatório

Tipo de saída	Indicador	Especificação	Impacto da falha de especificação*
Controlo Positivo	Controlo externo de ADN	23 de 24 variantes especificadas detetadas	Invalide manualmente as amostras dos doentes, com base nos resultados das amostras de controlo. O software do módulo de análise não invalida automaticamente as amostras de doentes, com base nos resultados da amostra de controlo.
	Controlo externo de ARN	12 de 13 variantes especificadas detetadas	
Controlo sem modelo	Cobertura média de exões em ADN para TSO Comprehensive (UE)	$\leq 8$	Invalide manualmente as amostras dos doentes, com base nos resultados das amostras de controlo. O software do módulo de análise não invalida automaticamente as amostras de doentes, com base nos resultados da amostra de controlo.
	Gene de ARN acima do limiar médio	$\leq 1$	

\*Os resultados bem-sucedidos mostram PASS (Passou).

- O relatório TSO Comprehensive (UE), que está disponível nos formatos PDF e JSON, resume os resultados do controlo de qualidade. Os relatórios estão na pasta de análise. Consulte o Manual do fluxo de trabalho do módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (documento n.º 200008661), para a localização da pasta de análise (contém relatórios PDF e JSON) e a pasta do ensaio.
- Repita ensaios de sequenciação que sejam inválidos.
- Repita os testes dos bancos com os seguintes resultados:
  - Bancos de ADN contaminados
  - Bancos de ARN inválidos
  - Os testes podem ser repetidos para obter mais resultados de variantes ou biomarcadores para bancos de ADN, que foram invalidados para um banco, mas não para todos os tipos de variantes.
- Os controlos positivos são avaliados para identificação de variantes. Se os controlos positivos não cumprirem as especificações de identificação de variantes, invalide manualmente o ensaio de sequenciação. O software do módulo de análise não invalida automaticamente as amostras de doentes, com base nos resultados da amostra de controlo.
- Os NTC são avaliados em comparação com a cobertura média do exão para ADN e genes acima do limiar mediano para ARN. Se os controlos negativos não cumprirem as especificações, invalide manualmente o evento de preparação do banco e todas as execuções de sequenciação associadas. O software do módulo de análise não invalida automaticamente as amostras de doentes, com base nos resultados da amostra de controlo.

- Execute medidas de controlo de qualidade adicionais, de acordo com os regulamentos locais, de estado e/ou federais ou requisitos de acreditação.

Para obter mais informações sobre a repetição de ensaios de sequenciação ou testes de bancos, consulte [Resolução de problemas na página 89](#).



## Resolução de problemas

Use a seguinte tabela para resolver problemas no fluxo de trabalho. Se um ensaio de sequenciação ou preparação de banco para uma amostra falhar duas vezes, poderá ser necessária uma resolução de problemas adicional. Contacte a Assistência Técnica da Illumina.

Observação	Causa possível	Ação recomendada
Ensaio de sequenciação não passa nas especificações de controlo de qualidade de ensaio	Erro de utilizador ou do equipamento laboratorial no fluxo de trabalho do ensaio	<p>Repita a preparação de banco a partir de um dos seguintes passos, dependendo de onde o erro de utilização ou do equipamento se suspeita ter ocorrido. Se desconhecido, ou tiverem ocorrido outros erros, contacte a Assistência Técnica da Illumina para resolver os problemas do seu ensaio.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ressequência de bancos da placa PCR de bancos normalizados (NL). Consulte <a href="#">Preparar para sequenciação na página 77</a>.</li> <li>Volte a enriquecer bancos da placa PCR para amostras de banco amplificadas (ALS). Consulte <a href="#">Configuração da primeira hibridação na página 60</a>.</li> <li>Inicie a preparação de bancos, desde o início do fluxo de trabalho. Consulte <a href="#">ARN desnaturado e hibridado na página 46</a> ou <a href="#">Fragmento de ADN genómico na página 51</a>.</li> </ul>
	Problema dos instrumentos	Contacte a Assistência Técnica da Illumina.
Erro na produção do relatório ou erro geral do instrumento (erro de rede, erros ao carregar/descarregar reagentes, etc.)	Problema de instrumentos ou software	Consulte o Manual do fluxo de trabalho do módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (documento n.º 200008661) para obter ajuda com a produção de relatórios. Contacte a Assistência Técnica da Illumina para ajuda adicional.
O banco de ADN não passa nas especificações de controlo de qualidade	Os requisitos para a entrada de amostras não foram cumpridos	Certifique-se de que a amostra é introduzida corretamente e repita a preparação do banco, a partir do passo Fragmentos de ADN genómico. Consulte <a href="#">Requisitos das amostras na página 28</a> e <a href="#">Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28</a> .

Observação	Causa possível	Ação recomendada
O banco de ADN não passa nas especificações de controlo de qualidade (continuação)	Erro de utilização ou do equipamento no fluxo de trabalho do ensaio	<p>Repita a preparação de banco a partir de um dos seguintes passos, dependendo de onde o erro de utilização ou do equipamento se suspeita ter ocorrido. Se desconhecido, ou tiverem ocorrido outros erros, contacte a Assistência Técnica da Illumina para resolver os problemas do seu ensaio.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ressequência de bancos da placa PCR de bancos normalizados (NL). Consulte <a href="#">Preparar para sequenciação na página 77</a>.</li> <li>• Volte a enriquecer bancos da placa PCR para amostras de banco amplificadas (ALS). Consulte <a href="#">Configuração da primeira hibridação na página 60</a>.</li> <li>• Inicie a preparação de bancos, desde o início do fluxo de trabalho. Consulte <a href="#">Fragmento de ADN genómico na página 51</a>.</li> </ul>
	CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE critérios não foram cumpridos	<p>Reveja as advertências e precauções para obter informações sobre como evitar a contaminação cruzada.</p> <p>Reveja o esquema da placa e a indexação do banco, para certificar-se de que os bancos do mesmo índice não foram sequenciados em conjunto.</p> <p>Inicie a preparação de bancos, desde o início do fluxo de trabalho. Consulte <a href="#">Fragmento de ADN genómico na página 51</a>.</p> <p>Pode ter ocorrido contaminação durante a extração da amostra. Pode ser necessário repetir a extração para garantir que a amostra está livre de contaminação.</p>

Observação	Causa possível	Ação recomendada
	MSI utilizável falhou	<p>Reveja as definições do fabricante do ultrassonicador para utilização e funcionamento (incluindo nível de água e tipo de tubo). Certifique-se de que a amostra é introduzida adequadamente no ensaio.</p> <p>Consulte <a href="#">Requisitos das amostras na página 28</a> e <a href="#">Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28</a>.</p> <p>Pode ser necessária uma nova extração da amostra e/ou repetição do passo de fragmentos de ADN genómico, se a amostra estiver excessivamente fragmentada ou danificada.</p>
	A amostra pode estar demasiado fragmentada ou apresentar danos no ácido nucleico, que têm impacto na capacidade de gerar bancos únicos suficientes	<p>Reveja as definições do fabricante do ultrassonicador para utilização e funcionamento (incluindo nível de água e tipo de tubo). Certifique-se de que a amostra é introduzida adequadamente no ensaio.</p> <p>Consulte <a href="#">Requisitos das amostras na página 28</a> e <a href="#">Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28</a>.</p> <p>Pode ser necessária uma nova extração da amostra e/ou repetição do passo de fragmentos de ADN genómico, se a amostra estiver excessivamente fragmentada ou danificada.</p>
O banco de ARN não passa nas especificações de controlo de qualidade	Os requisitos para a entrada de amostras não foram cumpridos	<p>Certifique-se de que a amostra é introduzida adequadamente e repita a preparação do banco a partir do passo ARN desnaturado e hibridado.</p> <p>Consulte <a href="#">Requisitos das amostras na página 28</a> e <a href="#">Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28</a>.</p>

Observação	Causa possível	Ação recomendada
	<p>Erro de utilização ou do equipamento no fluxo de trabalho do ensaio</p>	<p>Repita a preparação de banco a partir de um dos seguintes passos, dependendo de onde o erro de utilização ou do equipamento se suspeita ter ocorrido. Se desconhecido, ou tiverem ocorrido outros erros, contacte a Assistência Técnica da Illumina para resolver os problemas do seu ensaio.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ressequência de bancos da placa PCR de bancos normalizados (NL). Consulte <a href="#">Preparar para sequenciação na página 77</a>.</li> <li>• Volte a enriquecer bancos da placa PCR para amostras de banco amplificadas (ALS). Consulte <a href="#">Configuração da primeira hibridação na página 60</a>.</li> <li>• Inicie a preparação de bancos, desde o início do fluxo de trabalho. Consulte <a href="#">ARN desnaturado e hibridado na página 46</a>.</li> </ul>
	<p>A amostra pode estar demasiado fragmentada ou apresentar danos no ácido nucleico, que têm impacto na capacidade de gerar bancos únicos suficientes</p>	<p>Certifique-se de que a amostra é introduzida corretamente. Consulte <a href="#">Requisitos das amostras na página 28</a> e <a href="#">Extração, quantificação e armazenamento de ácido nucleico na página 28</a>. Pode ser necessária uma nova extração da amostra, se esta estiver excessivamente fragmentada ou danificada.</p>

Observação	Causa possível	Ação recomendada
Falha do controlo positivo (ADN/ARN)	Os requisitos de entrada de amostras para o controlo positivo não foram cumpridos	<p>Certifique-se de que a introdução é adequada ao ensaio.</p> <p>Reveja a disposição da placa e certifique-se de que os reagentes adequados (sondas, índices) estão nos poços adequados.</p> <p>Certifique-se de que a amostra de controlo positivo é armazenada de acordo com a etiqueta. Repita a preparação de banco a partir de um dos seguintes passos, dependendo de onde o erro de utilização ou do equipamento se suspeita ter ocorrido. Se desconhecido, ou tiverem ocorrido outros erros, contacte a Assistência Técnica da Illumina para resolver os problemas do seu ensaio.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ressequência de bancos da placa PCR de bancos normalizados (NL). Consulte <a href="#">Preparar para sequenciação na página 77</a>.</li> <li>• Volte a enriquecer bancos da placa PCR para amostras de banco amplificadas (ALS). Consulte <a href="#">Configuração da primeira hibridação na página 60</a>.</li> <li>• Inicie a preparação de bancos, desde o início do fluxo de trabalho. Consulte <a href="#">ARN desnaturado e hibridado na página 46</a> ou <a href="#">Fragmento de ADN genómico na página 51</a>.</li> </ul>
	Erro de utilização ou do equipamento no fluxo de trabalho do ensaio	
Falha de NTC (ADN/ARN)	Ocorreu contaminação cruzada ou contaminação da área de trabalho	<p>Reveja a secção Advertências e precauções para obter informações sobre a descontaminação de áreas de trabalho.</p> <p>Reveja as advertências e precauções para obter informações sobre como evitar a contaminação cruzada.</p> <p>Reveja o esquema da placa e a indexação do banco, para certificar-se de que os bancos do mesmo índice não foram sequenciados em conjunto.</p> <p>Repita a preparação do banco, desde o início do fluxo de trabalho, para todos os bancos que partilham o controlo sem modelo.</p>
	Indexação incorreta do banco	

Observação	Causa possível	Ação recomendada
O software indica que os controlos positivos e/ou negativos não foram incluídos no ensaio de sequenciação	Atribuição incorreta de tipo de tumor no planeamento do ensaio Local Run Manager	Recoloque a análise em fila de espera com os controlos corretamente identificados, conforme indicado no Manual do fluxo de trabalho do módulo de análise do Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (UE) (documento n.º 200008661).

## Caraterísticas de desempenho

TSO Comprehensive (UE) é um painel NGS visado com 517 genes. Variantes pequenas de ADN — variantes de nucleótido único (SNV), variantes de nucleótidos múltiplos (MNV), inserções e deleções — são elegíveis para notificação dos 517 genes. As amplificações de genes são elegíveis para comunicação a partir dos genes MET e ERBB2. As fusões são elegíveis para notificação a partir dos 23 genes indicados na [TSO Comprehensive \(UE\) Painel de genes do ensaio na página 2](#). As variantes de união exão-intrão são elegíveis para notificação a partir dos genes MET e EGFR. Para serem comunicadas, as variantes têm de ser detetadas e ter evidências no ensaio KB TSO Comprehensive (UE) e serem elegíveis com base no tipo de tecido testado. Para serem comunicadas, as fusões de NTRK requerem que o parceiro de fusão seja 5' e que o domínio da quinase NTRK ou RET esteja intacto.

Para variantes pequenas de ADN, foi realizada uma abordagem representativa à validação dos genes visados no painel com dados que representam SNV, MNV, inserções e eliminações. Para amplificações de genes, fusões e variantes de união exão-intrão, o teste foi realizado ao nível do gene. A TMB e a MSI foram avaliadas onde indicado. Para os pedidos de NTRK Fusions CDx, as fusões em amostras FFPE foram testadas em estudos focados no desempenho específico para a reivindicação (como, por exemplo, limite de deteção, precisão interna do laboratório, reprodutibilidade, precisão e desempenho clínico).

A [Tabela 42](#) fornece definições de indicadores calculadas em vários estudos.

Tabela 42 Definições de indicadores

Prazo	Definição
Conformidade percentual positiva (PPA)	A percentagem de positivos corretamente identificados a partir do total de positivos, relativamente a um método ortogonal.
Conformidade percentual negativa (NPA)	A percentagem de negativos corretamente identificados do total de negativos, relativamente a um método ortogonal.
Conformidade percentual global (OPA)	A percentagem de positivos e negativos corretamente identificados a partir da observação total, relativamente a um método ortogonal.
Concordância percentual positiva (PPC)	A percentagem de identificações positivas corretamente identificadas a partir do total de positivos, relativamente a uma condição de controlo, numa comparação direta emparelhada.
Concordância percentual negativa (NPC)	A percentagem de identificações negativas corretamente identificadas a partir do total de negativos, relativamente a uma condição de controlo, numa comparação direta emparelhada.

Prazo	Definição
Identificação percentual positiva (PPC)	Percentagem de observações positivas para um alvo, entre as observações que se espera serem positivas para o mesmo.
Identificação percentual negativa (NPC)	Percentagem de observações que são negativas para um alvo, entre as observações que se espera serem negativas para o mesmo.

## Contaminação cruzada

O estudo de contaminação cruzada de amostras foi realizado para avaliar se os resultados falsos positivos, devido à contaminação cruzada de poço para poço, durante a preparação de banco de amostras, bem como à contaminação de ensaio para ensaio entre ensaios de sequenciação consecutivos, ocorrem no ensaio TSO Comprehensive (UE). Foram utilizadas duas amostras de ADN e duas de ARN, com variantes únicas e não sobrepostas, para avaliar a contaminação cruzada. Trinta e duas bancos de ADN e 32 bancos de ARN foram preparados três vezes por dois operadores numa disposição de painel de verificação com amostras alternadas, para avaliar a contaminação poço a poço, e com índices alternados para avaliar a contaminação de sequenciação de ensaio a ensaio, quando sequenciadas consecutivamente no mesmo Instrumento NextSeq 550Dx. Para avaliar a contaminação cruzada, foram avaliadas variantes pequenas de ADN (que também têm impacto na TMB) e variantes de ARN (MSI e amplificações de genes não foram avaliadas). O estudo de contaminação cruzada mostrou zero eventos de contaminação observados, ao examinar as variantes detetadas em cada amostra, sem deteção de falsos positivos.

## Avaliação de kits de extração de ácido nucleico

Foram avaliados três kits de extração de ADN e ARN disponíveis comercialmente, com o TSO Comprehensive (UE). Os três kits de extração isolaram ADN e ARN das mesmas secções de tecido FFPE. Os kits diferiram nos seus passos de ligação do agente de desparafinação e do ácido nucleico ([Tabela 43](#)). O kit 1 foi o kit de extração predominante utilizado para determinar o desempenho do TSO Comprehensive (UE).

Tabela 43 Características do kit

Kit	Agente de desparafinação	Ligação de ácido nucleico
1	Próprio	Coluna
2	Xileno	Coluna
3	Óleo mineral	Esférulas magnéticas

Sete amostras (5 tecidos FFPE e 2 linhas celulares FFPE) foram extraídas em duplicado por 2 operadores repetidos em 3 dias, para cada um dos 3 kits de extração (7 amostras x 3 kits de extração x 2 operadores de extração x 3 dias de extração x 2 réplicas de extração).



A [Tabela 44](#) resume os efeitos dos kits de extração na validade do banco e na identificação de variantes. Para a validade do banco, a maior diferença de taxa entre os kits de extração foi relatada e a significância foi determinada por uma análise quantitativa dos indicadores do banco. Para identificação de variantes, se as médias do kit de extração tiverem sido significativamente diferentes, a diferença foi relatada.

Os kits de extração foram observados para confirmar a eventual afetação dos indicadores de validade do banco para variantes pequenas de ADN/TMB e MSI. Os indicadores de validade do banco para ampliações de genes e ARN não foram significativamente diferentes entre kits de extração. Os kits de extração não afetaram a procura de variantes pequenas de ADN e pontuação de TMB. Para a pontuação de MSI e ampliações de genes, não foram detetados falsos positivos, não tendo uma análise quantitativa encontrado diferenças significativas nas amostras negativas. Os kits de extração foram avaliados no que diz respeito à possibilidade de terem valores diferentes de leitura de apoio, para avaliar se as fusões e as variantes de união exão-intrão perto do LoD poderiam não ser detetadas devido à seleção do kit de extração.

O kit de extração selecionado deve ser utilizado na verificação das características de desempenho do TSO Comprehensive (UE) pelo laboratório e na produtividade de uma validade adequada do banco.

Tabela 44 Impactos do kit de extração na validade do banco e na identificação de variantes

Tipo de variante	Taxa de validade do banco (Maior diferença)	Identificação de variantes (Maior diferença média na variável subjacente)
Variantes pequenas de ADN	Kit 2 significativamente inferior ao Kit 3 (10%)	Não significativo
TMB		Não significativo
MSI	Kit 1 significativamente inferior ao Kit 3 (14%)	Não foram detetados falsos positivos Falsos negativos não avaliados
Amplificação genética	Não significativo (5%)	Não foram detetados falsos positivos Falsos negativos não avaliados
Fusões	Não significativo (3%)	Kit 1 significativamente inferior ao Kit 3 (11%)
Variantes de união exão-intrão		Kit 1 significativamente inferior ao Kit 3 (11%)

## Substâncias interferentes

O impacto de potenciais substâncias endógenas e exógenas no desempenho do ensaio TSO Comprehensive (UE) foi avaliado em 16 amostras FFPE únicas de tipos de cérebro, tireoide, cólon, mama, pulmão, próstata, pele e tecidos moles. Foram adicionadas substâncias endógenas, melanina e hemoglobina, às amostras, durante o processo de extração de ácidos nucleicos. Estiveram presentes substâncias exógenas (etanol, xileno e proteinase K), durante o processo de extração de ácidos nucleicos e também foram adicionadas ao ácido

nucleico purificado, antes da preparação do banco. A adição de proteinase K extra durante o processo de extração também foi avaliada, tendo sido observada interferência com proteinase K enriquecida. Houve um controlo endógeno não enriquecido e controlo exógeno com tampão ou enriquecido com água para cada uma das 16 amostras únicas. O efeito da necrose foi avaliado num conjunto diferente de oito amostras FFPE de tecidos do pulmão, cérebro e cólon. Houve um controlo sem necrose macrodissecada em cada amostra de necrose. Para todos os interferentes, foram testadas quatro réplicas por amostra por substância com o ensaio TSO Comprehensive (UE) e comparadas com o respetivo controlo para deteção de variantes pequenas de ADN, ampliações de genes, fusões de ARN e variantes de união exão-intrão de ARN, bem como para o estado de MSI e a pontuação de TMB.

## Deteção de variantes de ADN

A melanina (0,2 µg/ml), hemoglobina (2 mg/ml), etanol (5%), proteinase K (0,04 mg/ml) e xileno (0,0001%) não interferem com a pontuação de TMB, estado de MSI, variantes pequenas de ADN e ampliações de genes.

## Deteção de variantes de ARN

Os dados não suportam qualquer interferência da hemoglobina (2 mg/ml), melanina (0,2 µg/ml), etanol (5%) e xileno (0,0001%) em fusões de ARN ou variantes de união exão-intrão. Da mesma forma, não houve interferência na deteção de variantes de ARN quando foram adicionados 0,02 mg/ml de proteinase K a ARN, antes do evento de preparação do banco e quando são adicionados até 2,6 mg/ml de proteinase K à amostra, durante o processo de purificação de ARN.

Alguns falsos positivos em relação aos controlos sem interferente foram observados entre bancos replicados para fusões de ARN com hemoglobina, melanina, etanol e xileno, e para variantes de união exão-intrão de ARN com melanina e xileno. Da mesma forma, foram observados alguns falsos negativos nalguns bancos replicados para variantes de união exão-intrão de ARN com hemoglobina, melanina, xileno e 0,02 mg/ml de proteinase K. No entanto, em todos os casos, os falsos positivos e falsos negativos foram considerados problemas de amostra, porque as observações para eventos detetados mostraram leituras de apoio perto do LoD. Por conseguinte, os falsos positivos e falsos negativos em todas as réplicas foram considerados não relacionados com a interferência e foram atribuídos à variação aleatória do número de leituras de apoio para fusões e/ou variantes de união exão-intrão no LoD ou abaixo deste.

## Necrose

A presença de tecido necrótico até 70% não interfere com a pontuação de TMB, estado de MSI, variantes pequenas de ADN ou deteção de variantes de união exão-intrão de ARN. As fusões de ARN e a deteção de amplificação genética são afetadas em amostras com conteúdo de necrose  $\geq 25\%$ , na área do tecido. Se a secção da amostra contiver mais de 25% de necrose, na área total do tecido, o tecido necrótico tem de ser macrodissecado.

## Estabilidade

### Estabilidade em tempo real

A estabilidade em tempo real foi utilizada para estabelecer o prazo de validade do kit do ensaio TSO Comprehensive (UE), quando armazenado de acordo com as condições do rótulo. A conceção do estudo baseou-se no teste de 3 lotes de reagentes e utilizou a conceção clássica de estudos de estabilidade descrita na orientação EP25-A do CLSI. Os kits foram armazenados em configuração final de kit durante todo o estudo, nas condições de armazenamento definidas no rótulo do produto. Os componentes do kit congelado foram armazenados entre -15 °C e -25 °C. Os componentes do kit refrigerado foram armazenados entre 2 °C e 8 °C. Os componentes à temperatura ambiente foram armazenados entre 15 °C e 30 °C.

Os kits foram testados quanto à aparência e critérios funcionais de dispensa do kit em pontos temporais especificados. Além disso, foram analisadas tendências de identificação de variantes e de indicadores de CQ de amostras, para o material de controlo de CQ. O prazo de validade foi determinado para cada reagente. Os prazos de validade são atribuídos com base na data de fabrico e vida útil. O prazo de validade do kit é atribuído com base no reagente que expira mais cedo.

### Estabilidade do kit utilizado

A estabilidade do kit utilizado no ensaio TSO Comprehensive (UE) foi avaliada sob condições de utilização comum, durante o prazo de validade para suportar várias utilizações do kit. O kit de reagentes foi sujeito a várias congelações/descongelações e testado para suportar até 4 utilizações do kit. Além disso, foram preparados 8 bancos de ARN e 8 bancos de ADN num total de 3 vezes, para testar o número máximo de bancos suportados (24 bancos de ADN e 24 bancos de ARN por kit). Todos os critérios funcionais de dispensa do kit foram cumpridos para todos os ciclos de congelação/descongelação e pontos temporais testados. Foram realizados testes de amostras FFPE com reagentes com idade  $\geq$  25 meses, para avaliar o impacto dos testes utilizados na identificação de variantes. Uma análise qualitativa das variantes visadas demonstra que os eventos utilizados não afetaram a identificação das variantes.

### Estabilidade do banco

A estabilidade de bancos preparados com o ensaio TSO Comprehensive (UE) foi avaliada utilizando 8 amostras de ADN FFPE e 8 amostras de ARN FFPE de 9 tipos de tecido diferentes testados em triplicado no ensaio. Os bancos da placa PCR de Banco Normalizado (NL) foram agrupados e sequenciados no dia 0. O volume restante dos bancos na placa PCR de NL foi armazenado congelado (-25 °C a -15 °C), depois novamente agrupado e sequenciado no dia 30. Quaisquer resultados estatisticamente significativos para variantes pequenas de ADN entre o dia 0 e o dia 30 foram tecnicamente insignificantes. Não houve diferenças estatísticas entre os resultados do dia 0 e do dia 30 para o estado de MSI, pontuação de TMB, amplificações de genes, fusões de ARN e variantes de união exão-intrão de ARN. Os dados indicam que os bancos gerados a partir do ensaio TSO Comprehensive (UE) são estáveis por um período máximo de 30 dias entre -25 °C e -15 °C.

## Estabilidade do tecido FFPE colocado em lâminas

A estabilidade dos tecidos FFPE colocados em lâminas para utilização no ensaio TSO Comprehensive (UE) foi avaliada através da segmentação de blocos FFPE (secções de 5 µm) a partir de 16 amostras únicas que representam 9 tipos de tecido, colocação em lâminas, seguido de armazenamento à temperatura ambiente durante 3 pontos temporais: 1 dia (controlo), 4 semanas e 8 semanas. Os ácidos nucleicos (ADN e ARN) foram extraídos no ponto temporal indicado e, em seguida, armazenados congelados até que as extrações para todos os pontos temporais estivessem concluídas. O ARN extraído foi armazenado entre -65 °C e -85 °C e o ADN extraído foi armazenado entre -25 °C e -15 °C. Para cada ponto temporal, foram testadas três réplicas por amostra no ensaio TSO Comprehensive (UE) e comparadas com o controlo para variantes pequenas de ADN, estado de MSI, pontuação de TMB, amplificações de genes, fusões de ARN e variantes de união exão-intrão de ARN. Os dados indicam que os tecidos FFPE colocados em lâminas para utilização no ensaio TSO Comprehensive (UE) são estáveis por um período máximo de 4 semanas.

## Proteção da titulação de entrada de ácido nucleico

A entrada de ácido nucleico para o ensaio TSO Comprehensive (UE) foi avaliada testando ADN de 33 amostras FFPE que englobam 17 tipos de tecido, a níveis de entrada que variam entre 10 ng e 500 ng, e testando ARN de 5 amostras FFPE de 5 tipos de tecido a níveis de entrada que variam entre 10 ng e 85 ng. Os indicadores de CQ do banco foram avaliados e estavam dependentes da amostra. Os resultados de ADN demonstraram que alguns, mas não todos, os indicadores de CQ da amostra de ADN respondem a uma entrada aumentada acima da entrada nominal de 40 ng:

- MEDIAN\_INSERT\_SIZE não respondeu à entrada acima de 30 ng.
- MEDIAN\_EXON\_COVERAGE mostrou uma correlação positiva com o aumento do entrada.
- PCT\_EXON\_50X aumentado com o aumento da entrada até 80 ng.
- USABLE\_MSI\_SITES aumentou com o aumento da entrada. Algumas amostras com menos de 40 USABLE\_MSI\_SITES a 40 ng cumpriram a especificação em entradas mais elevadas, o que permitiria calcular uma pontuação de MSI.
- MEDIAN\_BIN\_COUNT\_CNV\_TARGET aumentou com o aumento da entrada.
- Aumentar a entrada para aumentar COVERAGE\_MAD, em direção ao limite superior de especificação.

Os indicadores de CQ da amostra de ARN aumentaram (MEDIAN\_INSERT\_SIZE e TOTAL\_ON\_TARGET\_READS) ou diminuíram (MEDIAN\_CV\_GENE\_500X) de 10 ng para 40 ng, mas em geral não mudaram entre 40 ng e 85 ng de entrada.

## Limite de branco

A percentagem de falsos positivos (do total de negativos esperados) foi avaliada através de testes replicados de tecido adjacente FFPE normal ou benigno, que não deve conter variantes somáticas para variantes pequenas de ADN, amplificações de genes, MSI, fusões de ARN e variantes de união exão-intrão de ARN. Não foram analisados falsos positivos para TMB, uma vez que não existe um limiar clínico. Seis amostras de ADN e 6

amostras de ARN FFPE foram processadas em duplicado com 2 operadores, ao longo de 3 dias para cada um dos 2 lotes de reagentes. Um subconjunto de amostras foi reagrupado e ressequenciado num formato 3x ADN apenas e 3x ARN, apenas para avaliar falsos positivos com várias configurações multiplexadas suportadas por este dispositivo. Além disso, foram processadas 30 amostras de ARN adicionais em duplicado, que foram processadas com 1 lote de reagente, dividido entre 2 operadores. No total, houve 168 observações possíveis para ADN e 228 observações para ARN, reduzidas por bancos inválidos para cada tipo de variante. A percentagem de falsos positivos foi calculada ao nível do gene para amplificações e ao nível da posição (aproximadamente 1,9 milhões de posições) para variantes pequenas de ADN. A percentagem de falsos positivos para tipos de variantes de ADN é apresentada na [Tabela 45](#). A percentagem de falsos positivos para fusões de ARN e variantes de união exão-intrão foi de 0%, conforme mostrado na [Tabela 46](#).

Tabela 45 Falso positivos por tipo de variante de ADN

Tipo de variante	Falsos positivos
Amplificações de genes	0% (0/9912)
Variantes pequenas de ADN	0,0001% (271/295.801.567)
MSI	0% (0/156)
TMB	ND*

\* Os falsos positivos não são aplicáveis porque a TMB é comunicada como uma pontuação e não tem um resultado qualitativo.

Tabela 46 Falsos positivos por tipo de variante de ARN

Tipo de variante	Falsos positivos
Fusão	0% (0/226)
Variante de união exão-intrão	0% (0/226)

## Limite de deteção

Foram realizados dois estudos para avaliar os limites de deteção para TSO Comprehensive (UE). O estudo 1 avaliou variantes pequenas de ADN RET, fusões RET e fusões NTRK1 – 3. O estudo 2 avaliou outras variantes de perfil tumoral.

### Estudo 1

Foram determinados os Limites de Deteção (LoD) de variantes pequenas de ADN NTRK1, NTRK3 e RET e fusões NTRK1 – 3 e RET. O LoD corresponde ao valor mais baixo do analito (por exemplo, frequência de alelos de variantes ou leituras de apoio) que pode ser detetado de forma consistente (limite de deteção de 95% ou um erro de tipo II de 5%). Foram utilizados no estudo tecidos FFPE com variantes pequenas de ADN RET (cancro medular da tiroide), fusões RET (cancro papilar da tiroide, tumor Spitz atípico) e fusões NTRK1 – 3 (glioma de baixo grau, glioblastoma multiforme, sarcoma miofibroblástico, sarcoma, carcinoma secretor da mama, cancro do cólon), bem como uma linha celular tratada com FFPE com variantes pequenas de ADN NTRK1 e NTRK3.

Cada amostra foi diluída a pelo menos 5 níveis de teste (variando entre aproximadamente 0,01 – 0,10 VAF para variantes pequenas de ADN e 2 – 25 leituras de apoio para fusões). Houve 18 observações para cada nível de teste por lote por variante geradas por 3 operadores e 3 instrumentos de sequenciação, que iniciaram a preparação do banco em 3 dias não consecutivos com 2 réplicas de cada nível de teste da amostra. Foram testados dois lotes de reagentes.

Para variantes de ADN, os 2 lotes foram analisados independentemente utilizando a regressão probit ou a abordagem de taxa de sucesso (nível de teste mais baixo com uma taxa de sucesso (estimação pontual)  $\geq 95\%$ ) para determinar o LoD para cada variante por lote. O LoD maior nos dois lotes de reagentes foi considerado como o limite de deteção para a variante (Tabela 47).

Para fusões de ARN, foram utilizadas linhas celulares FFPE para estimar os valores de LoD para cada gene de fusão. Os LoD foram então verificados com tecidos FFPE utilizando preparações de banco duplicadas em 3 operadores, 3 instrumentos e 3 lotes de reagentes, para gerar 54 observações por variante perto do LoD estabelecido com linhas celulares FFPE. Os limites de deteção reivindicados para cada fusão (Tabela 48) são as leituras de apoio médias mais baixas, que atingiram uma taxa de sucesso (estimação pontual)  $\geq 95\%$ .

Tabela 47 Limite de deteção para variantes pequenas de ADN NTRK1, NTRK3 e RET

Marcador	Cr	Posição	Referência	Alternativa	Limite de deteção (Frequência de alelos de variantes)
NTRK1 G595R (SNV)*	Cr1	156846342	G	A	0,038
NTRK3 F617L (SNV)*	Cr15	88476283	A	G	0,032
NTRK3 G623R (SNV)*	Cr15	88476265	C	T	0,036
NTRK3 G696A (SNV)*	Cr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Cr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Cr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Cr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (deleção)*	Cr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

Cr = Cromossoma

\* Estas variantes de ADN foram analisadas por regressão probit; as outras variantes de ADN foram analisadas pela abordagem da taxa de sucesso.

Tabela 48 Limite de detecção para fusões NTRK e RET

Gene	Fusão	Limite de detecção (Leituras de apoio)
NTRK1	TPM3-NTRK1	20,2
	BCAN-NTRK1	53,2
NTRK2	STRN-NTRK2	13,6
	ETV6-NTRK2	20,3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13,5
	ETV6-NTRK3	16,2
RET	NCOA4-RET	15,8
	KIF5B-RET	16,6

## Estudo 2

Os limites de detecção (LoD) das variantes de perfil tumoral relatadas por TSO Comprehensive (UE) foram avaliados. O LoD corresponde ao valor mais baixo do analito (frequência de alelos de variantes ou leituras de apoio) que pode ser detetado de forma consistente (taxa de sucesso de 95% ou um erro de tipo II de 5%). Foram diluídas amostras FFPE de 17 tipos de tecido contendo variantes para vários níveis de teste. Foram geradas seis observações por nível por dois operadores, cada um utilizando um lote de reagente e um instrumento diferentes.

## Variantes de ADN

Os LoD de 10 classes de variantes pequenas de ADN (25 variantes no total) e 2 amplificações de genes de ADN (ERBB2 e MET) foram determinados e resumidos como intervalos ([Tabela 49](#)). As variantes RET do LoD do Estudo 1 também estão incluídas. Duas de 3 inserções superiores a 5 bp tinham um LoD de 0,034 e um VAF de 0,036, tendo a terceira um LoD de 0,215 de VAF. Esta última foi uma inserção numa região de baixa complexidade, onde a inserção adiciona repetições adicionais, afeta o alinhamento e requer mais leituras para uma detecção consistente. Por conseguinte, alguns contextos genómicos de baixa complexidade podem ter impacto na detecção de inserções > 5 pb.

Tabela 49 Limite de detecção para variantes pequenas de ADN e ampliações de genes

Tipo (Unidade de medida para LoD)	Classe de variante/contexto genômico	Número de variantes	Intervalo
Variantes pequenas de ADN (frequência de alelos de variantes)	SNV	5	0,016–0,064
	MNV	3	0,022– 0,048
	Inserção (1-2 bp) repetições próximas de homopolímero	2	0,086–0,104
	Inserção (1-2 bp) repetições próximas de dinucleótidos	2	0,038–0,051
	Inserção (3-5 bp)	2	0,030– 0,056
	Inserção (> 5 bp e até 25 bp)	3	0,034–0,215
	Deleção (1-2 bp) de repetições próximas de homopolímero	2	0,094–0,100
	Deleção (1-2 bp) repetições próximas de dinucleótidos	2	0,033– 0,070
	Deleção (3-5 bp)	2	0,028– 0,064
	Deleção (> 5 e até 25 bp)	2	0,047– 0,055
Amplificações de genes (fold change)	Por gene (ERBB2, MET)	2	2,034–2,195

## Fusões

Os LoD foram determinados para 18 fusões, contabilizando 20 genes no painel TSO Comprehensive (UE), que variaram entre 10 e 54,7 suportando leituras ([Tabela 50](#)). No outro estudo, foram testados 3 genes adicionais (NTRK1 – 3). O gene RET foi testado aqui e no outro estudo de LoD. Dezasseis fusões com LoD determinados tinham dados consistentes com um LoD comum de 16 suportando leituras utilizando um limite confiante superior (UCL) bilateral de 95%. Duas fusões tinham LoD de 24,7 e 44,2 suportando leituras que não eram consistentes com o LoD comum.

A fusão FGFR2-SRPK2 com um valor de LoD de 24,7 suportando leituras teve regiões de sobreposição repetidas no ponto de corte, conforme anotado pelo software do ensaio TSO Comprehensive (UE). As regiões repetidas dentro de um ponto de corte normalmente têm níveis mais baixos de evidência, uma vez que as leituras podem mapear outro local no genoma ou podem permanecer desalinhadas. Além disso, as regiões repetidas tornam o processo de montagem (utilizado para identificar sequências de fusão) mais desafiante e requerem evidências adicionais para construir a sequência correta. O SEPT14-EGFR é outro exemplo de uma fusão com sequência homóloga no ponto de corte.



A fusão BCL2-IGHJ5 com um valor de LoD de 44,2 suportando leituras tinha um gene muito curto (IGHJ5) com o ponto de corte próximo do início de um exão, que requer alinhamentos curtos espaçados. Consequentemente, foram necessárias mais leituras para uma deteção consistente.

Tabela 50 Limite de deteção para fusões

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

## Variantes de união exão-intrão

As 2 variantes de união exão-intrão de ARN, MET e EGFR, tinham um LoD de 18,7 e 24,8, suportando leituras, respetivamente.

## Conteúdo tumoral

Os resultados do estudo informam as recomendações para o conteúdo tumoral para amostras clínicas. Em geral, quanto maior for o conteúdo tumoral, maior será o “sinal” (VAF, fold change ou leituras de apoio) para variantes no tumor. As recomendações de conteúdo tumoral mínimo baseiam-se nas seguintes observações. Os valores de LoD para variantes pequenas de ADN não são superiores a um VAF de 0,104 (com exceção da inserção TP53). Para detetar mutações do impulsor no tumor (frequência de alelos de variantes 0,50),

recomenda-se um conteúdo tumoral de 20%, para que estas mutações tenham um VAF de 0,10 e estejam no LoD ou acima deste. A 20% do conteúdo tumoral, os genes amplificados para um fold change de 5,5 vezes (11 cópias), seriam consistentemente detetados com base num Limite de Deteção de um fold change de 1,8 vezes. Com um conteúdo tumoral de 20%, as fusões com 80 leituras de apoio seriam detetadas de forma consistente com base num Limite de Deteção de 16 leituras de apoio.

## Reprodutibilidade

Foram realizados dois estudos para avaliar a reprodutibilidade do ensaio TSO Comprehensive (UE). O estudo 1 avaliou variantes pequenas de ADN de RET além das variantes de fusão NTRK e RET. O estudo 2 avaliou variantes adicionais de perfil tumoral.

### Estudo 1

Este estudo foi realizado para avaliar a reprodutibilidade do ensaio TSO Comprehensive (UE) em 3 centros de teste (1 interno, 2 externo) com 2 operadores por local, 2 réplicas intra-ensaio e 3 dias de teste não consecutivos. Os testes foram realizados com um painel de reprodutibilidade, incluindo amostras de ADN contendo variantes pequenas de ADN RET específicas conhecidas e amostras de ARN contendo variantes de fusão de NTRK1 – 3 e RET específicas conhecidas de amostras de tecido e linhas celulares fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE). O painel continha membros do painel de ADN e ARN com níveis baixos de variante e níveis elevados de variante com o mesmo número de membros do painel de nível baixo e elevado para cada classe de variante. Os membros do painel de alto nível foram alvo de aproximadamente 2 a 3 vezes o LoD e os membros do painel de baixo nível foram alvo de aproximadamente o LoD. Em cada centro, cada operador testou os membros do painel em duplicado 3 vezes, gerando 6 observações por alvo por membro do painel. Dos 3 centros, foram geradas 36 observações por membro do painel (3 centros/instrumentos × 2 operadores × 2 réplicas intra-ensaio × 3 dias de início).

As percentagens de identificações positivas (PPC) e as percentagens de identificações negativas (PNC) para variantes pequenas de ADN visadas e variantes de fusão de ARN visadas a nível elevado foram determinadas como os critérios de avaliação primários. As PPC e as PNC para variantes pequenas de ADN visadas e variantes de fusão de ARN visadas a baixo nível foram calculadas como critérios de avaliação secundários. Os intervalos de confiança (IC) bilaterais de 95%, associados a todos os critérios de avaliação são calculados através do método de pontuação de Wilson. Foram realizadas análises primárias para estimar a PPC e a PNC (com IC de 95% associados) nos membros do painel de nível elevado visado, combinando observações do ensaio TSO Comprehensive (UE) para um determinado alvo num grupo de membros do painel que representa a classe de variante aplicável (por exemplo, variantes pequenas de ADN e fusões de ARN) entre centros/instrumentos, operadores e ensaios. Para cada variante visada, as observações do ensaio TSO Comprehensive (UE) noutros membros do painel no nível elevado visado para o mesmo tipo de variante, mas não contendo a mesma variante, conforme determinado pela regra da maioria, foram combinadas com a PNC calculada. A PPC e a PNC globais para os membros do painel visado de baixo nível foram determinados de forma semelhante.

## Variantes pequenas de ADN RET

Para os membros do painel de variantes pequenas de ADN de nível elevado, a PPC global foi de 100,0% (207/207; IC de 95%: 98,2% a 100,0%) (Tabela 51). O PNC global para os membros do painel de variantes pequenas de ADN de nível elevado foi de 100,0% (1035/1035; IC de 95%: 99,6% a 100,0%) (Tabela 52). Para os membros do painel de variantes pequenas de ADN visadas de elevado nível, a PPC global para os membros do painel de variantes pequenas de ADN visadas de baixo nível foi de 99,1% (210/212; IC de 95%: 96,6% a 99,7%) e a PNC global foi de 100,0% (1026/1026; IC de 95%: 99,6% a 100,0%).

Tabela 51 PPC do ensaio TSO Comprehensive (UE) para deteção de variantes pequenas de ADN RET, em membros do painel visado de elevado nível e baixo nível

Nível de variante	Tipo de variante	Variante visada (Nucleótido)	Variante visada (Aminoácido)	n	VAF médio	Percentagem de identificações positivas (%)	IC* de 95%
Elevado	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0% (34/34)	(89,8%, 100,0%)
Elevado	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Elevado	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0% (33/33)	(89,6%, 100,0%)
Elevado	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Elevado	Deleção	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0% (33/33)	(89,6%, 100,0%)
Elevado	Inserção	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Elevado	Todas as variantes pequenas de ADN são elevadas	Todas as variantes pequenas de ADN são elevadas	Todas as variantes pequenas de ADN são elevadas	207	ND	100,0% (207/207)	(98,2%, 100,0%)

Nível de variante	Tipo de variante	Variante visada (Nucleótido)	Variante visada (Aminoácido)	n	VAF médio	Percentagem de identificações positivas (%)	IC* de 95%
Baixo	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Baixo	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3% (33/35)	(81,4%, 98,4%)
Baixo	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Baixo	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Baixo	Deleção	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0% (34/34)	(89,8%, 100,0%)
Baixo	Inserção	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Baixo	Todas as variantes pequenas de ADN são baixas	Todas as variantes pequenas de ADN são baixas	Todas as variantes pequenas de ADN são baixas	212	ND	99,1% (210/212)	(96,6%, 99,7%)

Abreviaturas: N/A, não aplicável; VAF, frequência de alelos de variantes.

\* Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

Tabela 52 PNC do ensaio TSO Comprehensive (UE) para deteção de variantes pequenas de ADN RET, em membros do painel visado de elevado nível e baixo nível

Nível de variante	Tipo de variante	Variante visada (Nucleótido)	Variante visada (Aminoácido)	n <sup>1</sup>	Percentagens de identificações negativas (%)	IC <sup>2</sup> de 95%
Elevado	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0% (173/173)	(97,8%, 100,0%)
Elevado	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0% (171/171)	(97,8%, 100,0%)
Elevado	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0% (174/174)	(97,8%, 100,0%)
Elevado	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0% (172/172)	(97,8%, 100,0%)
Elevado	Deleção	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0% (174/174)	(97,8%, 100,0%)
Elevado	Inserção	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_ T636dup	171	100,0% (171/171)	(97,8%, 100,0%)
Elevado	Todas as variantes pequenas de ADN são elevadas	Todas as variantes pequenas de ADN são elevadas	Todas as variantes pequenas de ADN são elevadas	1035	100,0% (1035/1035)	(99,6%, 100,0%)
Baixo	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0% (177/177)	(97,9%, 100,0%)
Baixo	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0% (143/143)	(97,4%, 100,0%)
Baixo	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)

Nível de variante	Tipo de variante	Variante visada (Nucleótido)	Variante visada (Aminoácido)	n <sup>1</sup>	Percentagens de identificações negativas (%)	IC <sup>2</sup> de 95%
Baixo	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Baixo	Deleção	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0% (178/178)	(97,9%, 100,0%)
Baixo	Inserção	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_ T636dup	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Baixo	Todas as variantes pequenas de ADN são baixas	Todas as variantes pequenas de ADN são baixas	Todas as variantes pequenas de ADN são baixas	1026	100,0% (1026/1026)	(99,6%, 100,0%)

<sup>1</sup> Todas as observações agrupadas a partir de combinações de membros-variantes do painel para as quais a identificação maioritária é negativa, ou seja, variantes visadas que albergam fusões com menos de 50% das identificações positivas.

<sup>2</sup> Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

A [Tabela 53](#) mostra a análise de componentes de variância das frequências de alelos de variantes (VAF) nas aproximadamente 36 observações para cada membro do painel. O desvio-padrão (SD) e o coeficiente de variação percentual (% de CV; total e para cada fonte) foram calculados e apresentados para cada variante pequena de ADN RET visada.

Tabela 53 TSO Comprehensive (UE) Análise de componentes de variância do ensaio do VAF, em membros do painel de variantes pequenas de ADN visadas

Nível de variante	Tipo de variante	Variante visada (Nucleótido)	Variante visada (Aminoácido)	n	VAF médio	SD do centro (% de CV)	Operador SD (% de CV)	SD do dia (% de CV)	SD replicado (% de CV)	SD total (% de CV)
Elevado	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%)
Elevado	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%)
Elevado	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%)
Elevado	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%)
Elevado	Deleção	chr10_43615611_ GAGATGTTTATG A_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%)
Elevado	Inserção	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%)
Baixo	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%)
Baixo	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%)

Nível de variante	Tipo de variante	Variante visada (Nucleótido)	Variante visada (Aminoácido)	n	VAF médio	SD do centro % de CV)	Operador SD (% de CV)	SD do dia (% de CV)	SD replicado (% de CV)	SD total (% de CV)
Baixo	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%)
Baixo	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%)
Baixo	Deleção	chr10_43615611_GAGATGTTTATG A_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%)
Baixo	Inserção	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%)



## Fusões NTRK 1 – 3 e RET

Para os membros do painel de fusão de ARN de nível elevado, a PPC global foi de 99,3% (285/287; IC de 95%: 97,5% a 99,8%) (Tabela 54). A PPC foi de 100% para cada membro do painel de nível elevado, exceto para o membro do painel BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; IC de 95%: 81,9% a 98,5%]). A PNC global para os membros do painel de fusão de ARN de nível elevado foi de 100,0% (1724/1724; IC de 95%: 99,8% a 100,0%) (Tabela 55). Para os membros do painel de fusão de ARN visada de baixo nível, a PPC global foi de 95,4% (272/285; IC de 95%: 92,3%, 97,3%) e a PNC global foi de 100,0% (1851/1851; IC de 95%: 99,8% a 100,0%).

Tabela 54 PPC do ensaio TSO Comprehensive (UE) para deteção de fusões NTRK e RET em membros do painel visado de nível elevado e baixo nível

Nível de variante	Fusão visada	n	Média de leituras de apoio	Percentagem de identificações positivas (%)	IC* de 95%
Elevado	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Elevado	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4% (34/36)	(81,9%, 98,5%)
Elevado	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Elevado	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Elevado	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Elevado	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Elevado	NCOA4-RET	36	36,7	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Elevado	CCDC6-RET	36	33,4	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Elevado	Todas as fusões elevadas	287	36,5	99,3% (285/287)	(97,5%, 99,8%)
Baixo	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4% (34/36)	(81,9%, 98,5%)
Baixo	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6% (29/36)	(65,0%, 90,2%)
Baixo	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3% (33/35)	(81,4%, 98,4%)

Nível de variante	Fusão visada	n	Média de leituras de apoio	Percentagem de identificações positivas (%)	IC* de 95%
Baixo	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Baixo	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Baixo	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Baixo	NCOA4-RET	36	15,8	97,2% (35/36)	(85,8%, 99,5%)
Baixo	KIF5B-RET	34	16,6	97,1% (33/34)	(85,1%, 99,5%)
Baixo	Todas as fusões baixas	285	16,8	95,4% (272/285)	(92,3%, 97,3%)

\* Os intervalos de confiança (IC) bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

Tabela 55 PNC do ensaio TSO Comprehensive (UE) para deteção de fusões NTRK e RET em membros do painel não visado de nível elevado e baixo nível

Nível de variante	Fusões visadas	n <sup>1</sup>	Percentagens de identificações negativas (%)	IC <sup>2</sup> de 95%
Elevado	LMNA-NTRK1	180	100,0% (180/180)	(97,9%, 100,0%)
Elevado	BCAN-NTRK1	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Elevado	ETV6-NTRK2	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Elevado	TRIM24-NTRK2	216	100,0% (216/216)	(98,2%, 100,0%)
Elevado	ETV6-NTRK3	144	100,0% (144/144)	(97,4%, 100,0%)
Elevado	BTBD1-NTRK3	216	100,0% (216/216)	(98,2%, 100,0%)
Elevado	NCOA4-RET	215	100,0% (215/215)	(98,2%, 100,0%)
Elevado	CCDC6-RET	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)

Nível de variante	Fusões visadas	n <sup>1</sup>	Percentagens de identificações negativas (%)	IC <sup>2</sup> de 95%
Elevado	Todas as fusões – elevadas	1724	100,0% (1724/1724)	(99,8%, 100,0%)
Baixo	LMNA-NTRK1	213	100,0% (213/213)	(98,2%, 100,0%)
Baixo	BCAN-NTRK1	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Baixo	ETV6-NTRK2	250	100,0% (250/250)	(98,5%, 100,0%)
Baixo	STRN-NTRK2	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Baixo	ETV6-NTRK3	177	100,0% (177/177)	(97,9%, 100,0%)
Baixo	BTBD1-NTRK3	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Baixo	NCOA4-RET	213	100,0% (213/213)	(98,2%, 100,0%)
Baixo	KIF5B-RET	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Baixo	Todas as fusões – baixas	1851	100,0% (1851/1851)	(99,8%, 100,0%)

<sup>1</sup> Todas as observações agrupadas a partir de combinações de membros-variantes do painel para as quais a identificação maioritária é negativa, ou seja, variantes visadas que albergam fusões com menos de 50% das identificações positivas.

<sup>2</sup> Os intervalos de confiança (IC) bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

A [Tabela 56](#) mostra a análise dos componentes de variância das leituras de apoio nas aproximadamente 36 observações, em cada fusão visada. O SD e a % de CV (total e para cada fonte) foram calculados e apresentados para cada fusão visada.

Tabela 56 TSO Comprehensive (UE) Análise de componentes de variância do ensaio de leituras de apoio em membros do painel de fusão de ARN visado

Nível de variante	Fusão	n	Média de leituras de apoio	SD do centro (% de CV)	SD do operador (% de CV)	SD do dia (% de CV)	SD replicado (% de CV)	SD total (% de CV)
Elevado	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9%)	3,37 (9%)	6,93 (18%)	9,04 (24%)	12,39 (33%)

Nível de variante	Fusão	n	Média de leituras de apoio	SD do centro (% de CV)	SD do operador (% de CV)	SD do dia (% de CV)	SD replicado (% de CV)	SD total (% de CV)
Elevado	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41%)	7,87 (23%)	5,40 (16%)	8,95 (27%)	18,98 (57%)
Elevado	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33%)	3,50 (14%)	4,20 (17%)	4,86 (20%)	10,86 (44%)
Elevado	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31%)	4,24 (12%)	6,82 (19%)	6,87 (19%)	15,57 (43%)
Elevado	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20%)	10,20 (18%)	9,25 (16%)	8,69 (15%)	19,93 (35%)
Elevado	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5%)	2,65 (8%)	2,16 (7%)	10,47 (32%)	11,11 (34%)
Elevado	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13%)	4,09 (11%)	6,17 (17%)	5,20 (14%)	10,17 (28%)
Elevado	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22%)	2,56 (8%)	6,53 (20%)	5,51 (16%)	11,49 (34%)
Baixo	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13%)	0,00 (0%)	2,74 (20%)	4,37 (32%)	5,47 (40%)
Baixo	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17%)	2,98 (18%)	4,61 (27%)	5,82 (34%)	8,52 (50%)
Baixo	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0%)	3,41 (22%)	3,83 (25%)	4,39 (29%)	6,75 (45%)
Baixo	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13%)	0,61 (5%)	2,33 (17%)	2,57 (19%)	3,95 (29%)
Baixo	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24%)	3,46 (14%)	0,00 (0%)	6,39 (26%)	9,44 (38%)
Baixo	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5%)	0,00 (0%)	0,00 (0%)	6,64 (37%)	6,71 (37%)
Baixo	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13%)	1,03 (7%)	0,00 (0%)	5,11 (32%)	5,61 (36%)
Baixo	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12%)	0,00 (0%)	1,58 (10%)	5,83 (35%)	6,39 (39%)

% de CV: Coeficiente de variação percentual.

SD: Desvio-padrão.

## Estudo 2

Foi realizado um segundo estudo para avaliar a reprodutibilidade do ensaio TSO Comprehensive (UE) em 3 centros de teste (2 externos e 1 interno), 2 operadores/instrumentos por local, 3 lotes de reagentes únicos, 4 dias de teste (não consecutivos) e 2 ensaios de sequenciação por banco de amostras.

Os testes foram realizados utilizando amostras de ADN e ARN extraídas de 41 amostras de tecido FFPE e 1 linha celular FFPE (com 1 amostra de tecido FFPE e a linha celular FFPE utilizadas para criar 2 membros de painel cada). As amostras de tecido consistiram nos seguintes tipos: bexiga, osso, cérebro, mama, cólon, jejuno, rim, fígado, pulmão, ovário, próstata, pele, tecidos moles, estômago, tireoide e útero. Foi testado um total de 44 membros do painel, incluindo membros do painel de ADN com variantes pequenas de ADN (SNV, MNV, inserções e deleções), ampliações de genes, pontuações de TMB diferentes, pontuações de MSI elevadas e membros do painel de ARN com fusões genéticas e variantes de união exão-intrão. A maioria dos membros do painel tinha variantes visadas conhecidas a níveis de aproximadamente 2 a 3 vezes o limite de detecção específico da variante ( $\sim 2-3 \times \text{LoD}$ ).

O LoD é a concentração de analitos em que os resultados do ensaio observados são positivos (variante detetada em relação ao limiar do ensaio TSO Comprehensive (UE))  $\geq 95\%$  do tempo. Os níveis médios de variantes observadas foram classificados como aproximadamente  $< 2 \times \text{LoD}$  (níveis de variantes observadas a  $< 1,5 \times \text{LoD}$ ),  $\sim 2-3 \times \text{LoD}$  (níveis de variantes observadas a  $1,5 \times \text{LoD}$  a  $3,4 \times \text{LoD}$ ) e aproximadamente  $> 3 \times \text{LoD}$  (níveis de variantes observadas a  $> 3,4 \times \text{LoD}$ ).

A percentagem de identificações positivas (PPC) para variantes pequenas de ADN, ampliações de genes, MSI-elevado (MSI-H) e variantes de ARN foi calculada combinando observações entre ensaios de sequenciação e centros. A percentagem de identificações negativas (PNC) foi calculada de forma semelhante para variantes pequenas de ADN, ampliações de genes e variantes de ARN. Para cada variante alvo conhecida, as observações do ensaio TSO Comprehensive (UE) em membros do painel do mesmo tipo de variante, mas contendo outras variantes, não derivadas da mesma amostra de origem, nem cumprindo a regra de maioria para essa variante (ou seja,  $< 50\%$  das identificações foram positivas) foram combinadas entre centros, operadores/instrumentos, dias, lotes de reagentes e ensaios de sequenciação para calcular a PNC. Os intervalos de confiança (IC) bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

## Variante pequenas de ADN

A [Tabela 57](#) mostra as PPC para variantes pequenas de ADN visadas. As PPC variaram de 91,3% para uma SNV BRAF a 100% para a maioria das variantes pequenas de ADN.

Tabela 57 PPC do ensaio TSO Comprehensive (UE) para detecção de variantes pequenas de ADN em membros do painel visado combinados

Nível de variante observado <sup>1</sup>	Tipo de variante	Variante visada (nucleótido)	Variante visada (aminoácido)	Média de VAF <sup>2</sup>	Percentagem de identificações positivas (%)	IC de 95% <sup>3</sup>
Aprox. 2-3xLOD	DELEÇÃO	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0% (28/28)	(87,9%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	DELEÇÃO	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0% (40/40)	(91,2%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	INSERÇÃO	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0% (32/32)	(89,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	INSERÇÃO	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	INSERÇÃO	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0% (4/4)	(51,0%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3% (42/46)	(79,7%, 96,6%)
Aprox. 2-3xLOD	DELEÇÃO	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_A750del	0,112	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0% (38/38)	(90,8%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	DELEÇÃO	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0% (44/44)	(92,0%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	INSERÇÃO	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0,075	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0% (38/38)	(90,8%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	INSERÇÃO	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	DELEÇÃO	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0% (44/44)	(92,0%, 100,0%)

Nível de variante observado <sup>1</sup>	Tipo de variante	Variante visada (nucleótido)	Variante visada (aminoácido)	Média de VAF <sup>2</sup>	Porcentagem de identificações positivas (%)	IC de 95% <sup>3</sup>
<2xLOD	INSERÇÃO	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0,157	100,0% (2/2)	(34,2%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	INSERÇÃO	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)

<sup>1</sup> Nível de variante calculado a partir da frequência média de alelos de variantes observada.

<sup>2</sup> Frequência média de alelos de variantes calculada a partir dos resultados do ensaio observados.

<sup>3</sup> Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

As PNC foram 100% em variantes pequenas de ADN.

A [Tabela 58](#) mostra a análise de componentes de variância de resultados do VAF para cada fonte de variação e variação total em todos os membros do painel com variantes pequenas de ADN visadas.

Tabela 58 Análise de componentes de variância do VAF para variantes pequenas de ADN visadas

Variante visada	N	VAF médio	SD do centro (% de CV)	SD do operador (centro) (% de CV)	SD dia (centro, operador) (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do ensaio (% de CV)	SD total (% de 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)

Variante visada	N	VAF médio	SD do centro (% de CV)	SD do operador (centro) (% de CV)	SD dia (centro, operador) (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do ensaio (% de CV)	SD total (% de CV)
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)

Havia duas variantes pequenas de ADN visadas, para as quais o número de observações era demasiado pequeno para que fosse utilizado um modelo de componentes de variância. Para estas duas variantes visadas, os SD globais foram de 0,027 para a variante chr1\_27024001\_C\_CG e 0,001 para a variante chr17\_7578470\_C\_CGGCGG.

## Amplificações de genes

[Tabela 59](#) mostra as PPC para amplificações de genes visadas. As PPC foram de 100,0% para MET e 100,0% para ERBB2.



Tabela 59 PPC do ensaio TSO Comprehensive (UE) para detecção de amplificações de genes em membros do painel visado combinado

Nível de variante observado <sup>1</sup>	Variante visada	Fold-change média observada <sup>2</sup>	Percentagem de identificações positivas (%)	IC de 95% <sup>3</sup>
Aprox. 2-3xLOD	MET	5,14	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	ERBB2	2,33	100,0% (47/47)	(92,4%, 100,0%)

<sup>1</sup> Nível de variante calculado a partir da fold change média observada.

<sup>2</sup> Fold change média calculada a partir dos resultados do ensaio observados.

<sup>3</sup> Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

Os PNC foram 100% em todas as amplificações de genes.

A [Tabela 60](#) mostra a análise de componentes de variância dos resultados da fold change para cada fonte de variação e variação total em todos os membros do painel, com amplificações de genes visadas.

Tabela 60 Análise de componentes de variância de fold change para amplificações de genes visadas

Variante visada	N	Fold change média	SD do centro (% de CV)	SD do operador (centro) (% de CV)	SD Dia (centro, operador) (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do ensaio (% de CV)	SD total (% de 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

[Tabela 61](#) mostra as PPC para os membros do painel MSI-H visado. As PPC foram de 100% para ambos os membros do painel MSI-H.

Tabela 61 PPC do ensaio TSO Comprehensive (UE) para detecção do estado de MSI-H em membros do painel visado combinado

Membro do painel	Pontuação média de MSI <sup>1</sup>	N	Percentagem de identificações positivas (%)	IC <sup>2</sup> de 95%
TPSBD4	60,5	36	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
TPSBD6	55,7	32	100,0% (32/32)	(89,3%, 100,0%)
Todos os membros		68	100,0% (68/68)	(94,7%, 100,0%)

<sup>1</sup> Pontuação de MSI média observada calculada a partir dos resultados do ensaio observados.

<sup>2</sup> Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

A [Tabela 62](#) apresenta a análise dos componentes de variância dos resultados da pontuação de MSI para cada fonte de variação e variação total em todos os membros do painel visados para o estado de MSI-H.

Tabela 62 Análise de componentes de variância da pontuação de MSI para membros do painel MSI-H visado

Membro do painel	N	Pontuação média de MSI	SD do centro (% de CV)	SD do operador (centro) (% de CV)	SD Dia (centro, operador) (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do ensaio (% de CV)	SD total (% de 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

Para avaliar a reprodutibilidade das pontuações de TMB, foi realizada uma análise quantitativa da pontuação em membros do painel de TMB visado, que representava um intervalo de pontuações de TMB esperadas. A [Tabela 63](#) mostra a análise dos componentes de variância dos resultados da pontuação de TMB para cada fonte de variação e variação total nos membros do painel de TMB. Os SD totais da pontuação de TMB foram de 1,0 (% de CV = 13) para um membro do painel (pontuação de TMB média = 7,6) e 1,1 (% de CV = 2) para outro membro do painel (pontuação de TMB média = 63,2).

Tabela 63 Análise de componentes de variância da pontuação de TMB para membros do painel TMB visado

Membro do painel	N	Pontuação de TMB média	SD do centro (% de CV)	SD do operador (centro) (% de CV)	SD Dia (centro, operador) (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do ensaio (% de CV)	SD total (% de 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)

Houve 1 membro do painel de TMB para o qual o número de observações era demasiado pequeno (N = 2), para que fosse utilizado um modelo de componentes de variância. Para este membro do painel, o SD global foi de 1,7.

## Variantes de ARN

A [Tabela 64](#) mostra as PPC para variantes de ARN visadas. As PPC variaram entre 91,7% para KIF5B-RET e 100% para a maioria das variantes de ARN.

Tabela 64 PPC do ensaio TSO Comprehensive (UE) para deteção de variantes de ARN em membros do painel visado combinados

Nível de variante observado <sup>1</sup>	Tipo de variante	Variante visada	Média de leituras de apoio <sup>2</sup>	Percentagem de identificações positivas (%)	IC de 95% <sup>3</sup>
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	ACPP-ETV1	44,7	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	EGFR-GALNT13	49,8	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	EML4-ALK	49,3	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	ESR1-CCDC170	45,1	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	FGFR1-GSR	61,1	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	FGFR3-TACC3	53,5	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Fusão	KIF5B-RET	11,6	91,7% (44/48)	(80,4%, 96,7%)
<2xLOD	Fusão	MKRN1-BRAF	33,4	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Fusão	PAX3-FOXO1	70,1	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Fusão	RAF1-VGLL4	15,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)

Nível de variante observado <sup>1</sup>	Tipo de variante	Variante visada	Média de leituras de apoio <sup>2</sup>	Percentagem de identificações positivas (%)	IC de 95% <sup>3</sup>
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	SPIDR-NRG1	51,5	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Fusão	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9% (47/48)	(89,1%, 99,6%)
Aprox. 2-3xLOD	Variante de união exão-intrão	EGFR vIII	64,0	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
Aprox. 2-3xLOD	Variante de união exão-intrão	Omissão do exão 14 do MET	61,2	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)

<sup>1</sup> Nível de variante calculado a partir da média observada das leituras de apoio.

<sup>2</sup> Média das leituras de apoio calculadas a partir dos resultados do ensaio observados.

<sup>3</sup> Os intervalos de confiança bilaterais de 95% são calculados através do método de pontuação de Wilson.

O PNC foi de 100% para cada variante de ARN visada, exceto para a fusão FGFR2-SRPK2 (PNC = 99,60% (984/988); IC de 95%: 98,96% a 99,84%).

A [Tabela 65](#) mostra a análise de componentes de variância de resultados de leitura de apoio para cada fonte de variação e variação total em todos os membros do painel com variantes de ARN visadas.

Tabela 65 Análise de componentes de variância de leituras de apoio para variantes de ARN visadas

Variante visada	N	Média de leituras de apoio	SD do centro (% de CV)	SD do operador (centro) (% de CV)	SD dia (centro, operador) (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do ensaio (% de CV)	SD total (% de 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)

Variante visada	N	Média de leituras de apoio	SD do centro (% de CV)	SD do operador (centro) (% de CV)	SD dia (centro, operador) (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do ensaio (% de CV)	SD total (% de CV)
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)
Variante de união exão-intrão EGFR vIII	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)
Omissão do exão 14 do MET pela variante de união exão-intrão	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

## Precisão interna do laboratório

Foram realizados dois estudos para avaliar a precisão interna do laboratório para o TSO Comprehensive (UE). O estudo 1 avaliou fusões de NTRK e RET e variantes pequenas de ADN de RET. O estudo 2 avaliou a TMB e a MSI.

### Estudo 1

A precisão interna do laboratório foi avaliada para NTRK1 – 3 fusões ( glioma de grau inferior, glioblastoma multiforme, sarcoma miofibroblástico, carcinoma secretor da mama), fusões RET (cancro da tireoide e tecido da pele de um cancro desconhecido) e variantes pequenas de ADN RET (cancro medular da tireoide) com tecidos FFPE dos cancros indicados. Cada amostra foi testada em dois níveis de variante: ~1x LoD (nível baixo de variante) e ~2 – 3x LoD (nível elevado de variante), exceto para a amostra que alberga o CCDC6-RET, que só foi testada no nível baixo de variante. Cada uma das amostras em cada nível de teste foi processada em duplicados, em cada evento de preparação do banco em três (3) operadores. Cada operador iniciou a preparação do banco em três (3) dias de início não consecutivos e sequenciado em três (3) instrumentos NextSeq 550Dx designados. Foram testados três (3) lotes de reagentes, gerando 54 observações por nível. Alguns níveis apresentaram menos de 54 observações devido a bancos inválidos.

### Análise qualitativa

A concordância qualitativa da identificação de variantes foi avaliada separadamente para os dois níveis de variantes, para uma determinada variante das observações agrupadas em todas as variáveis (operadores, lotes de reagentes, instrumentos, dias e réplicas). A percentagem de identificações positivas (PPC) e a percentagem de identificações negativas (PNC) e o intervalo de confiança bilateral de 95% associado (pontuação de Wilson) encontram-se resumidos na [Tabela 66](#) (variantes pequenas de ADN) e [Tabela 67](#) (fusões de ARN).

A um nível elevado de variante (~2 – 3x LoD), o ensaio TSO Comprehensive (UE) demonstrou 100% para a PPC e a PNC em todas as variantes testadas.

No nível baixo de variante (~1x LoD), a PPC para variantes pequenas de ADN variou entre 83,3% e 98,1% e a PPC para fusões de ARN variou entre 90,7% e 100%. Para variantes com PPC < 95%, os VAF médios (RET C634Y e RET D898\_E901del) ou leituras de apoio (NCOA4-RET e BCAN-NTRK1) estavam abaixo dos respetivos Limites de Detecção. No nível baixo de variante, foi alcançado 100% de PNC para todas as variantes.

Tabela 66 Resultados qualitativos para a variante de ADN visada

Nível de variante	Variante	Tipo de variante	VAF médio	PPC (IC de 95%)	PNC (IC de 95%)
Baixo (~1x LoD)	RET C634Y	MNV	0,028	83,3% (45/54) (71,3% – 91,0%)	100,0% (215/215) (98,2% – 100,0%)
	RET D898_E901del	DELEÇÃO	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*	DELEÇÃO	0,056	98,1% (53/54) (90,2% – 99,7%)	100,0% (215/215) (98,2% – 100,0%)

Nível de variante	Variante	Tipo de variante	VAF médio	PPC (IC de 95%)	PNC (IC de 95%)
Elevado (~3x LoD)	RET C634Y	MNV	0,095	100,0% (54/54) (93,4% – 100,0%)	100,0% (192/192) (98,0% – 100,0%)
	RET D898_E901del	DELEÇÃO	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*	DELEÇÃO	0,161	100,0% (32/32) (89,3% – 100,0%)	100,0% (214/214) (98,2% – 100,0%)

\* As alterações de nucleótidos são listadas para cada variante na secção Limite de Deteção, exceto para RET D631\_L633delinsE, que é Cromossoma 10, Posição 43609940, referência ACGAGCT, Alternativa A.



Tabela 67 Resultados qualitativos para fusões-alvo de ARN

Nível de variante	Fusão	Média de leituras de apoio	PPC (IC de 95%)	PNC (IC de 95%)
Baixo	TPM3-NTRK1	20,2	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (537/537) (99,3%, 100,0%)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4% (51/54) (84,9%, 98,1%)	100,0% (591/591) (99,4%, 100,0%)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (591/591) (99,4%, 100,0%)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (537/537) (99,3%, 100,0%)
	ETV6-NTRK3 (linha celular FFPE)	23,1	98,1% (53/54) (90,2%, 99,7%)	
	NCOA4-RET	13,3	90,7% (49/54) (80,1%, 96,0%)	100,0% (537/537) (99,3%, 100,0%)
	CCDC6-RET	18,7	98,1% (53/54) (90,2%, 99,7%)	100,0% (591/591) (99,4%, 100,0%)
	Elevado	TPM3-NTRK1	57,1	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)
BCAN-NTRK1		53,2	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (535/535) (99,3%, 100,0%)
ETV6-NTRK2		52,0	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (535/535) (99,3%, 100,0%)
ETV6-NTRK3		41,7	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (481/481) (99,2%, 100,0%)
ETV6-NTRK3 (linha celular FFPE)		28,3	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	
NCOA4-RET		24,8	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (481/481) (99,2%, 100,0%)
CCDC6-RET		ND	Não testado	100,0% (589/589) (99,4%, 100,0%)

## Análise quantitativa

Foi realizada uma análise de componentes de variância de probabilidade máxima restrita (REML), para avaliar a variação total da variável contínua subjacente (VAF para variantes pequenas de ADN e leituras de apoio para fusões de ARN) e estimar os componentes de precisão [desvio-padrão (SD), coeficiente de variação (CV)] para cada fonte de variação [operadores, instrumentos, dias, lotes de reagentes, residual e total]. Os resultados são apresentados na [Tabela 68](#) para variantes pequenas de ADN e [Tabela 69](#) para fusões de ARN.

A variação no VAF aumentou com a média esperada para uma proporção binomial. A variação nas leituras de apoio aumentou com a média, conforme esperado com os dados de contagem. O componente residual foi o maior contribuinte para a variância total para variantes pequenas de ADN e fusões de ARN em ambos os níveis, apoiando a conclusão de que a deteção destas variantes por TSO Comprehensive (UE) é robusta para operadores, lotes, instrumentos e dias.

Tabela 68 Resultados quantitativos de SD e CV para variantes pequenas de ADN visadas

Nível de VAF	Variante	Tipo de variante	N tentativas válidas	VAF médio	Operador SD (% de CV)	Instrumento SD (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD diário (% de CV)	Residual SD (% de CV)	Total SD (% de CV)
Baixo (~1x LoD)	RET D898_	DELEÇÃO	54	0,048	0,000	0,000	0,000	0,004	0,014	0,015
	E901del				(0,0)	(0,0)	(0,0)	(8,7)	(30,0)	(31,2)
	RET C618R	SNV	54	0,046	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,014
					(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(31,3)	(31,3)
	RET M918T	SNV	53	0,042	0,000	0,001	0,000	0,000	0,011	0,011
				(0,0)	(3,0)	(0,0)	(0,0)	(25,6)	(25,7)	
	RET C634Y	MNV	54	0,028	0,000	0,000	0,001	0,000	0,009	0,009
				(0,0)	(0,0)	(3,3)	(0,0)	(30,7)	(30,9)	
	RET D631_	DELEÇÃO	54	0,056	0,000	0,002	0,006	0,000	0,010	0,012
	L633delinsE				(0,0)	(3,0)	(11,6)	(0,0)	(18,5)	(22,0)

Nível de VAF	Variante	Tipo de variante	N tentativas válidas	VAF médio	Operador SD (% de CV)	Instrumento SD (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD diário (% de CV)	Residual SD (% de CV)	Total SD (% de CV)
Elevado (~3x LoD)	RET D898_E901del	DELEÇÃO	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	DELEÇÃO	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)

Tabela 69 Resultados quantitativos de SD e CV para fusões de ARN visadas

Nível de leituras de apoio	Fusão	N tentativas válidas	Média de leituras de apoio	SD do operador (% de CV)	SD do instrumento (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do dia (% de CV)	SD residual (% de CV)	SD total (% de CV)
Baixo	TPM3-NTRK1	54	20,2	2,3 (11,5)	0,9 (4,7)	3,3 (16,4)	0,8 (4,1)	5,7 (28,2)	7,1 (35,2)
	BCAN-NTRK1	54	22,1	3,4 (15,3)	1,4 (6,4)	1,8 (8,0)	0,0 (0,0)	6,0 (27,2)	7,3 (32,9)
	ETV6-NTRK2	54	20,3	0,0 (0,0)	3,2 (15,7)	4,4 (21,5)	0,0 (0,0)	8,3 (40,8)	9,9 (48,7)
	ETV6-NTRK3	54	16,2	2,3 (14,0)	2,4 (14,6)	2,2 (13,4)	0,0 (0,0)	4,7 (28,7)	6,1 (37,5)
	ETV6-NTRK3 (linha celular)	54	23,1	4,6 (19,7)	1,2 (5,1)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	6,7 (29,1)	8,2 (35,5)
	NCOA4-RET	54	13,3	1,7 (12,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	1,7 (12,6)	5,1 (38,3)	5,6 (42,2)
	CCDC6-RET	54	18,7	0,0 (0,0)	1,1 (6,1)	5,4 (29,1)	0,0 (0,0)	6,2 (33,0)	8,3 (44,4)

Nível de leituras de apoio	Fusão	N tentativas válidas	Média de leituras de apoio	SD do operador (% de CV)	SD do instrumento (% de CV)	SD do lote (% de CV)	SD do dia (% de CV)	SD residual (% de CV)	SD total (% de CV)
Elevado	TPM3-NTRK1	54	57,1	11,2 (19,6)	1,2 (2,1)	5,7 (9,9)	2,0 (3,5)	11,9 (20,8)	17,4 (30,5)
	BCAN-NTRK1	54	53,2	8,2 (15,5)	0,8 (1,4)	5,6 (10,5)	2,9 (5,4)	11,3 (21,3)	15,4 (28,9)
	ETV6-NTRK2	54	52	0,0 (0,0)	4,1 (7,8)	7,1 (13,6)	5,7 (11,0)	12,9 (24,9)	16,3 (31,4)
	ETV6-NTRK3	54	41,7	7,2 (17,2)	0,4 (1,0)	6,4 (15,4)	0,0 (0,0)	10,7 (25,8)	14,4 (34,6)
	ETV6-NTRK3 (linha celular)	54	28,3	7,9 (28,0)	1,0 (3,6)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	9,1 (32,0)	12,1 (42,6)
	NCOA4-RET	54	24,8	3,1 (12,3)	0,0 (0,0)	5,9 (23,9)	0,0 (0,0)	6,8 (27,3)	9,5 (38,3)

## Estudo 2

A precisão interna do laboratório foi avaliada para TMB e MSI. Foram utilizadas cinco amostras de ADN FFPE de NSCLC para TMB e sete amostras FFPE de CRC para MSI, incluindo microssatélites estáveis (MSS) e MSI elevada, para avaliar a precisão em diferentes níveis, em toda a gama de pontuações. Cada uma das amostras foi processada em duplicado em três (3) operadores, três (3) dias, com três (3) preparações de banco para três (3) lotes de reagentes, utilizando três instrumentos NextSeq 550Dx que geraram 54 observações por nível.

A concordância qualitativa foi avaliada para o estado de MSI. O ensaio TSO Comprehensive (UE) demonstrou uma concordância de 100% para a percentagem de identificações positivas e a percentagem de identificações negativas para o estado de MSI. Para a TMB, o ensaio TSO Comprehensive (UE) comunica uma pontuação de TMB; a concordância qualitativa não é aplicável.

A variação total da TMB e da pontuação de MSI, juntamente com a contribuição por fonte (instrumentos, operadores, lotes, dias e resíduos), foi quantificada utilizando um modelo de componentes de variância numa gama de pontuações. O desvio-padrão (SD) e o coeficiente de variação (CV) são apresentados na [Tabela 70](#) para a TMB e [Tabela 71](#) para a MSI, por nível. Alguns níveis apresentaram menos de 54 observações devido a bancos inválidos.

Tabela 70 Resultados quantitativos de SD e CV da pontuação de TMB

Level (Nível)	Pontuação de TMB média	N tentativas válidas	Operador SD (% de CV)	Instrumento SD (% de CV)	Lot SD (% de CV)	Dia SD (% de CV)	Residual SD (% de CV)	Total SD (% de 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%)

Tabela 71 Resultados quantitativos de SD e CV da pontuação de MSI

Estado da MSI	Level (Nível)	Pontuação média de MSI (%)	N tentativas válidas	Operador SD (% de CV)	Instrumento SD (% de CV)	Lot SD (% de CV)	Dia SD (% de CV)	Residual SD (% de CV)	Total SD (% de CV)
MS-estável	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-elevada	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%)

A variação nas pontuações de TMB tende a aumentar com a média esperada das distribuições teóricas dos dados de contagem. A variação nas pontuações de MSI, para níveis próximos da pontuação de MSI = 50, é superior à variação das pontuações de MSI mais próximas de 0 ou 100 consistente com a variabilidade das distribuições teóricas dos dados de proporção. O componente residual permaneceu o maior contribuidor para a variância total para as pontuações de MSI e de TMB, corroborando a conclusão de que as pontuações são robustas para operadores, lotes, instrumentos e dias.

Os valores de C5 e C95 em torno do limiar de 20,00% foram determinados para a MSI utilizando um perfil de precisão (Tabela 72).

Tabela 72 Intervalos para a MSI C5-C95

Pontuação	C5	C95
MSI	17,17%	23,32%

No entanto, uma vez que tanto a MSI como a TMB são biomarcadores complexos, o desempenho analítico pode variar de amostra para amostra. Ou seja, a variação da TMB depende não só do seu valor, mas também da composição das variantes na amostra, tais como tipo de variante (SNV, Indel) e nível de VAF (próximo do limiar de inclusão). Da mesma forma, a variação da MSI depende não só do seu valor, mas também da composição dos centros na amostra, tais como o número de centros que são instáveis e o valor de instabilidade por local.

O impacto do conteúdo tumoral nas pontuações de TMB e MSI foi avaliado. Para a maioria das amostras, o conteúdo tumoral  $\geq 30\%$  teve impacto insignificante nas pontuações de TMB acima de aproximadamente 10 mutações por megabase. As pontuações de TMB permaneceram relativamente inalteradas com o aumento do conteúdo tumoral. Para amostras com MSI elevada, o conteúdo tumoral apresentou uma correlação linear positiva com a pontuação de MSI. As amostras com MSI elevada permaneceram MSI-H em média, quando o conteúdo tumoral era de  $\geq 30\%$ . As amostras do endométrio comportaram-se de forma distinta, em relação aos outros tipos de tecido e verificou-se que necessitavam de uma maior quantidade de conteúdo tumoral para serem identificadas como MSI-H.

## Precisão para perfil tumoral

A detecção de variantes por ensaio TSO Comprehensive (UE) foi comparada com os resultados dos métodos de referência. As pequenas variantes de ADN e TMB foram comparadas com um método de NGS de exoma completo validado externo. As amplificações de genes foram comparadas com o mesmo método de NGS de exoma completo ou método validado de hibridação dupla in situ (DISH) para amplificações HER2. A MSI foi avaliada em comparação com um teste MSI-PCR validado. As variantes de união exão-intrão de ARN foram comparadas com um método validado de PCR quantitativa (RCP em tempo real). As fusões ROS1 e ALK foram comparadas com ensaios FISH validados. Todas as outras fusões foram comparadas com um método composto constituído por um ensaio NGS de ARN do exoma completo (RNGS1) validado, um painel NGS visado (RNGS2) e PCR digital de gotículas (ddPCR).

## Deteção de variantes pequenas de ADN

A detecção de variantes pequenas de ADN pelo ensaio TSO Comprehensive (UE) foi comparada com os resultados da sequenciação do exoma completo (WES), que utiliza WES com pares de amostras normais de tumor correspondentes para identificação de variantes pequenas de linhagem germinativa e somática. A comparação entre pequenas variantes, consistindo em variantes de nucleótido único (SNV), inserções e deleções, baseou-se em 124 amostras de 14 tipos de tecido diferentes, que eram válidos para TSO Comprehensive (UE) e WES. TSO Comprehensive (UE) mas não o ensaio WES pode detetar variantes de nucleótidos múltiplos (MNV, 2 – 3bp) que requerem faseamento. TSO Comprehensive (UE) As MNV foram avaliadas como SNV individuais contra o WES. Um resumo da concordância ao nível da variante, incluindo a conformidade percentual positiva (PPA) e a conformidade percentual negativa (NPA) para todas as identificações de variantes, é apresentado na [Tabela 73](#).

Tabela 73 Resumo de concordância para identificações de variantes pequenas avaliadas por estado germinativo ou somático

	WES somática identificada	WES germinativa identificada	WES não identificada
TSO Comprehensive (UE) identificada	382	33.163	426



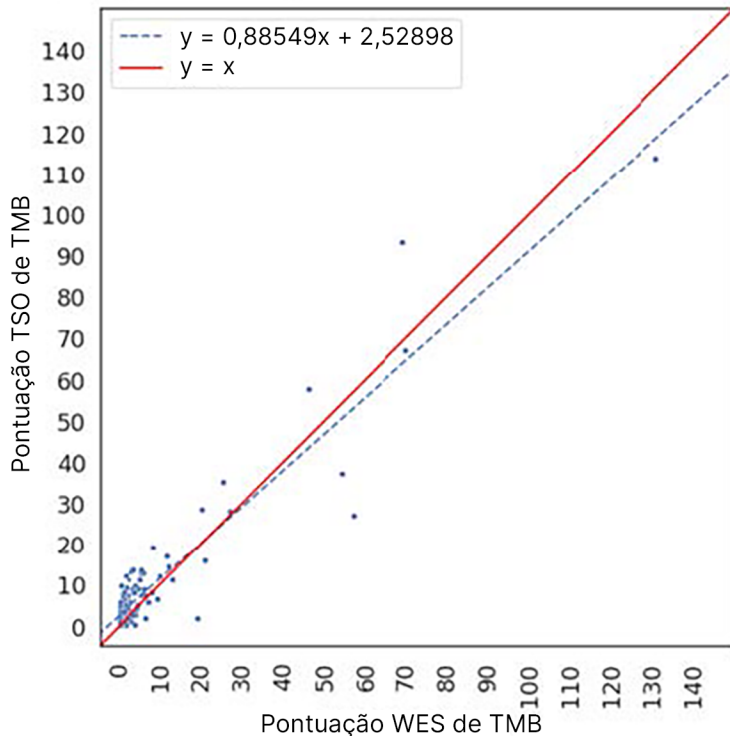
	WES somática identificada	WES germinativa identificada	WES não identificada
TSO Comprehensive (UE) não identificada	69	61	70.000.481
Total	451	33.224	70.000.907
Concordância percentual	PPA: 85% (382/451), IC de 95%: [81% – 87%]	PPA: > 99% (33.163/33.224) IC de 95%: (99,8% – 99,9%)	NPA: > 99% (70.000.481/70.000.907) IC de 95%: [99,999% – 99,999%]

No total, TSO Comprehensive (UE) identificou 426 variantes que não foram detetadas no método WES. Duzentas e quatro (48%) destas variantes tinham frequências de alelos de variantes abaixo do limiar para identificação no método WES. Das restantes variantes potencialmente falsas positivas, houve evidência da identificação da variante no método WES, com baixo apoio. Além disso, muitas das variantes tinham evidências WES de nível muito baixo nas amostras normais correspondentes. Este resultado sugere que estas variantes foram perdidas no tumor pela WES devido ao tumor em contaminação normal.

### Deteção de carga tumoral mutacional

A concordância da TMB foi determinada comparando as pontuações TMB (mutações somáticas/megabase) entre o método WES e TSO Comprehensive (UE) para 124 amostras com os dados disponíveis por TSO Comprehensive (UE) e WES. A análise de regressão linear com WES como preditor foi ordenada na origem de 2,53, declive de 0,89 e coeficiente de correlação de Pearson de 0,94 (Figura 3).

Figura 3 Correlação da pontuação de TMB entre WES e TSO Comprehensive (UE)



### Deteção de amplificação genética

A deteção de amplificações de genes pelo ensaio TSO Comprehensive (UE) foi comparada com os resultados do mesmo ensaio WES, utilizando amostras correspondentes de tumor normal ou amostras apenas tumorais. No total, foram 420 amostras das quais 183 utilizaram o método ortogonal/normal e 237 utilizaram o único método para tumores. As amostras eram de 14 tipos de tecido e continham amplificações de 55 genes. O TSO Comprehensive (UE) relata amplificações de genes dos genes MET e ERBB2. No entanto, a precisão foi avaliada para os 55 genes. É mostrado um resumo das identificações de amplificação genética na [Tabela 74](#).

Tabela 74 Identificações de amplificação genética

	WES positivo	WES negativo
TSO Comprehensive (UE) Positivo	337	415
TSO Comprehensive (UE) Negativo	28	24.000
Total	365	24.415
Concordância percentual	PPA: 92% (337/365) IC de 95%: [89%, 95%]	NPA: 98,3% (24.000/24.415) IC de 95%: [98,1%, 98,5%]

As amplificações de ERBB2 (HER2) em tecidos gástricos e mamários foram analisadas separadamente de outras amplificações de genes, utilizando um método duplo de hibridação in situ (DISH). No total, foram testadas 116 amostras mamárias e gástricas, das quais 64 tinham sido previamente caracterizadas como

positivas para HER2 por IHC ou FISH. Uma amostra falhou na extração, 3 amostras falharam a validade para TSO Comprehensive (UE) e 3 amostras falharam a validade para o ensaio DISH. Das 108 amostras, 20 (18,5%) apresentaram pontuações limites (entre 1,5 e 2,5) próximas ao limiar DISH de 2,0. Os resultados de concordância, incluindo PPA, NPA para todas as amostras e excluindo casos limite de DISH HER2 são mostrados na [Tabela 75](#).

Tabela 75 Resumo da concordância entre TSO Comprehensive (UE) e a DISH HER2, incluindo para amplificação do gene HER2

Amplificação do gene HER2 (Tecidos mamários e gástricos)	DISH HER2 amplificado	DISH HER2 não amplificado
TSO Comprehensive (UE) Positivo	17 (incluindo 1 limite)	13 (incluindo 1 limite)
TSO Comprehensive (UE) Negativo	10 (incluindo 6 limites)	68 (incluindo 12 limites)
Concordância percentual, incluindo casos-limites	PPA: 63% (17/27) IC de 95%: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) IC de 95%: [74%, 90%]
Concordância percentual, excluindo casos-limites	PPA: 80% (16/20) IC de 95%: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) IC de 95%: [72%, 90%]

## Deteção de instabilidade de microssatélites

A deteção de instabilidade de microssatélites pelo ensaio TSO Comprehensive (UE) foi comparada com os resultados de um teste MSI-PCR validado, que utiliza amostras de tumor com correspondência normal para testes. Foi comparado um total de 195 amostras, cumprindo o requisito de conteúdo tumoral de  $\geq 30\%$  e representando 14 tipos de tecido. O MSI-PCR avalia 5 centros e tem 3 resultados — MSS (sem centros instáveis), MSI-Low (um local instável) e MSI-High (dois ou mais centros instáveis). TSO Comprehensive (UE) avalia até 130 centros microssatélites e apenas classifica amostras como MSS ou MSI-High ( $\geq 20\%$  de centros instáveis). MSI-Low foram agrupados com resultados MSS para MSI-PCR. A análise de concordância é apresentada na [Tabela 76](#).

Tabela 76 Resumo da análise de concordância entre TSO Comprehensive (UE) e MSI-PCR para instabilidade de microssatélites de ADN

Instabilidade MSI	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSS
TSO Comprehensive (UE) Instável (MSI-High)	40	2	0
TSO Comprehensive (UE) Estável (MSS)	3	0	150
Total	43	2	150

Instabilidade MSI	PCR MSI-High	PCR MSI-Low	PCR MSS
Concordância percentual	PPA: 93% (40/43) IC de 95%: [81%, 98%]	NPA: 99% (150/152) IC de 95%: [95%, > 99%]	

## Deteção de variantes de união exão-intrão de ARN

A precisão para a deteção de variantes de união exão-intrão foi calculada comparando os resultados TSO Comprehensive (UE) com ensaios RCP em tempo real para EGFRvIII e Met Exon 14del, incluindo um ARN positivo conhecido para cada uma das variantes de união exão-intrão. A análise de concordância foi realizada num total de 230 amostras únicas de ARN de FFPE de 14 tipos de tecido, com dados disponíveis por ambos TSO Comprehensive (UE) e pelo método de referência. Todas as amostras foram testadas para MET Exon 14del, enquanto EGFRvIII foi testado apenas em tecido cerebral, respetivamente. Três amostras identificadas positivas para o MET Exon 14del por RCP em tempo real, mas não por TSO Comprehensive (UE) tinham Ct médio > 37 e estavam abaixo do nível do LoD TSO Comprehensive (UE). A [Tabela 77](#) resume os resultados do estudo de concordância.

Tabela 77 Resumo da análise de concordância entre TSO Comprehensive (UE) e o ensaio RCP em tempo real para variantes de união exão-intrão de ARN

Variantes de união exão-intrão de ARN	RCP em tempo real positivo	RCP em tempo real negativo
TSO Comprehensive (UE) Positivo (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (UE) Negativo (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive (UE) Positivo (Met Exon 14Del)	1	0
TSO Comprehensive (UE) Negativo (Met Exon 14Del)	3	217
Total	7	230
Concordância percentual	PPA: 57% (4/7) IC de 95%: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) IC de 95%: [98%, 100%]

## Deteção de fusão de ARN

### Comparação com um método composto

As fusões TSO Comprehensive (UE) foram comparadas com um método composto, que consistiu na sequenciação do exoma completo de ARN, utilizando um painel NGS (RNGS1), um painel de fusão NGS visada (RNGS2) e PCR digital de gotículas (ddPCR).

O método RNGS1 sobrepõe-se a todos os genes nos quais o TSO Comprehensive (UE) pode detetar fusões. No entanto, o limite de deteção do método RNGS1 foi de 4X – 8X do TSO Comprehensive (UE) com base no número de leituras de apoio observadas nas identificações de fusão sobrepostas. Assim, foi utilizado um método composto utilizando dois métodos adicionais com maior sensibilidade, mas menos amplitude para fusões com o método WES (RNGS1).

Foi testado um total de 255 amostras de ARN únicas, representando 14 tipos de tecido, tendo os indicadores TSO Comprehensive (UE) que passaram sido testados com RNGS1. Duas amostras eram inválidas para o CQ da amostra RNGS1 e foram excluídas da análise adicional. Das 82 fusões identificadas pela TSO Comprehensive (UE), 4 foram excluídas da avaliação devido a falhas do CQ da amostra RNGS1 e 7 fusões adicionais não eram identificáveis devido à ausência dos alvos no painel RNGS1. Das restantes 71 fusões chamadas por TSO Comprehensive (UE), 9 fusões foram confirmadas por RNGS1. RNGS1 identificou 4 fusões não identificadas por TSO Comprehensive (UE).

Das 62 fusões que foram positivas TSO Comprehensive (UE) e não detetadas pelo RNGS1, 13 sobrepuseram-se e foram confirmadas pelo RNGS2. Uma fusão foi identificada por RNGS2, mas não por TSO Comprehensive (UE).

A PCR digital de gotículas foi então utilizada para fusões identificadas pela TSO Comprehensive (UE), não identificadas ou não identificáveis pelo RNGS1 e não avaliáveis pelo RNGS2 (49). Além disso, a ddPCR foi utilizada para reavaliação de 2 das 4 fusões falsas negativas para TSO Comprehensive (UE) com RNGS1 e 2 de 9 fusões concordantes para TSO Comprehensive (UE) e RNGS1. Foram incluídas cinco amostras negativas para fusões com o teste de cada amostra de fusões positivas, para garantir a especificidade. Dezoito fusões não foram testadas com ddPCR devido à incapacidade de conceber primers/sondas, múltiplos parceiros genéticos para a fusão ou material FFPE restante insuficiente. Para ddPCR, as sondas e os primers foram concebidos em comparação com os valores de concentração crítica observados no ensaio TSO Comprehensive (UE).

No total, foram detetadas 52 fusões por ddPCR, 41 dessas fusões foram identificadas por TSO Comprehensive (UE), mas não identificadas ou não identificáveis por RNGS1. Nove fusões foram identificadas por ddPCR, mas foram negativas em TSO Comprehensive (UE) ou RNGS1. Duas fusões positivas para ddPCR confirmaram as 2 fusões concordantes para TSO Comprehensive (UE) e RNGS1. Não foi detetada qualquer fusão por ddPCR para os 2 TSO Comprehensive (UE) falsos negativos reavaliados com RNGS1, no entanto, estes foram contabilizados como falsos negativos com base na comparação de RNGS1.

Os métodos de resultados de concordância compostos RNGS1, RNGS2 e ddPCR para fusões são apresentados na [Tabela 78](#).

As 63 fusões concordantes com o método composto representaram 43 genes no painel TSO Comprehensive (UE). No entanto, as fusões são elegíveis para notificação apenas a partir dos 23 genes indicados no [TSO Comprehensive \(UE\) Painel de genes do ensaio na página 2](#).

Tabela 78 Tabulação cruzada de resultados de métodos compostos versus TSO Comprehensive (UE), para fusões de ARN (253 amostras)

Fusões	Método composto positivo	Método composto negativo
TSO Comprehensive (UE) Positivo	63 <sup>1</sup>	18

Fusões	Método composto positivo	Método composto negativo
TSO Comprehensive (UE) Negativo	14 <sup>2</sup>	13.821
Total	77	13.839
Concordância percentual	PPA: 82% (63/77) IC de 95%: [72%, 89%]	NPA: 99,9% (13.821/13.839) IC de 95%: [99,8%, 99,9%]

<sup>1</sup>63 TSO Comprehensive (UE) positivos verdadeiros = 9 positivos concordantes com RNGS1 + 13 positivos concordantes com RNGS2 + 41 positivos concordantes com ddPCR.

<sup>2</sup>14 TSO Comprehensive (UE) falsos negativos = 4 negativos não concordantes com RNGS1 + 1 negativo não concordantes com RNGS2 + 9 negativos não concordantes com ddPCR.

## Comparação com o método FISH para fusões ROS1 e ALK

Vinte e cinco amostras de NSCLC foram testadas por FISH para fusões ROS1 e ALK e 5 amostras adicionais de NSCLC foram testadas para fusões ROS1, respetivamente. Oito amostras falharam no FISH para ROS1, devido a tecido inadequado. Foram detetadas duas fusões ROS1 e uma ALK por TSO Comprehensive (UE) e FISH. Não foram observados resultados discordantes. [Tabela 79](#) resume os resultados de concordância TSO Comprehensive (UE) e o método FISH para fusões ROS1 e ALK.

Tabela 79 Resumo dos resultados de concordância TSO Comprehensive (UE) e do método FISH para fusões ROS1 e ALK

ALK+ROS1	FISH positivo	FISH negativo
TSO Comprehensive (UE) Positivo	3	0
TSO Comprehensive (UE) Negativo	0	44
Total	3	44
Concordância percentual	PPA: 100% (3/3) IC de 95%: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) IC de 95%: [92%, 100%]

## Validade da amostra

A validade da amostra (primeira tentativa) foi medida para 181 amostras únicas de ARN e 272 amostras únicas de ADN de blocos FFPE ≤ 5 anos de idade. Estas amostras foram selecionadas com base no tipo de tecido e material disponível; a validade do ensaio era desconhecida. Os indicadores de CQ do banco têm de passar para que o tipo de variante seja considerado válido. A validade da amostra foi avaliada separadamente para cada um dos tipos de variantes (variantes pequenas de ADN/TMB, MSI, amplificações de genes, fusões/variantes de união exão-intrão) e é apresentada na [Tabela 80](#).

Tabela 80 Validade da amostra

Tipo de variante	Validade da amostra
Fusões/Variantes de união exão-intrão (ARN)	76%
Variantes pequenas de ADN/TMB	75%
MSI	72%
Amplificação genética	94%

## Resumo da validação analítica para pedidos de perfil tumoral

Com base nos dados do limite de deteção, precisão, reprodutibilidade e exatidão, TSO Comprehensive (UE) é validado analiticamente para o seguinte:

- Variantes pequenas de ADN — SNV, MNV, inserções e deleções
- TMB
- MSI
- Amplificações dos genes MET e ERBB2 (HER2) (consulte a [TSO Comprehensive \(UE\) Painel de genes do ensaio na página 2](#)).
- 23 genes para os quais podem ser detetadas fusões (consulte a [TSO Comprehensive \(UE\) Painel de genes do ensaio na página 2](#)).
- Variantes de união exão-intrão EGFR e MET (consulte a [TSO Comprehensive \(UE\) Painel de genes do ensaio na página 2](#)).

## Desempenho clínico de NTRK

Para validar o ensaio TSO Comprehensive (UE) como um diagnóstico complementar (CDx), para a seleção de doentes para tratamento com VITRAKVI® (larotrectinib), foram testadas amostras de doentes incluídos nos ensaios clínicos com larotrectinib (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, referidas coletivamente como amostras do ensaio com larotrectinib) utilizando um limiar de dados de 15 de julho de 2019, complementado com amostras de tecido FFPE de origem comercial, para apoiar um Estudo de Precisão do ensaio TSO Comprehensive (UE) e um Estudo Clínico de Transposição.

NCT02122913 foi um estudo multicêntrico, aberto, de Fase 1, de escalonamento da dose em doentes adultos com tumores sólidos avançados (all-comers) não selecionados para cancro para fusão positiva de NTRK. Após a parte de escalonamento da dose do estudo, foi iniciada uma expansão da dose para doentes com cancro para fusão positiva de NTRK documentado e para doentes que o investigador acreditava poderem beneficiar de um inibidor TRK altamente seletivo. NAVIGATE NCT02576431 é um estudo de Fase 2 em curso, em regime aberto, em cesto em doentes com idade igual ou superior a 12 anos com tumores sólidos avançados recorrentes com uma fusão de NTRK documentada, conforme avaliado por um laboratório externo. O SCOUT NCT02637687 é um estudo de Fase 1/2 em curso, multicêntrico, em regime aberto, em doentes pediátricos com idade desde o nascimento até aos 21 anos com tumores sólidos avançados ou do sistema nervoso central (SNC) primários.

Dos doentes com fusão positiva de NTRK, incluídos no estudo do TSO Comprehensive (UE) ensaio, 164 formaram o conjunto de eficácia primária alargada de larotrectinib (ePAS4).

## Estudo de precisão para deteção de fusão de NTRK1, NTRK2, NTRK3

A precisão do ensaio TSO Comprehensive (UE) para detetar fusões de NTRK (NTRK1, NTRK2 ou NTRK3), em doentes com tumores sólidos, foi demonstrada através da avaliação da concordância dos resultados da fusão de NTRK entre o ensaio TSO Comprehensive (UE) e um método ortogonal validado com base na NGS.

Foi realizado um estudo retrospectivo, não interventivo. As amostras do ensaio de larotrectinib e as amostras suplementares foram testadas com o ensaio TSO Comprehensive (UE) num local externo e com um método ortogonal num laboratório central. A precisão das identificações de fusão de NTRK no ensaio TSO Comprehensive (UE) foi estimada em relação ao método ortogonal; foram calculadas a conformidade percentual positiva (PPA), a conformidade percentual negativa (NPA) e os intervalos de confiança (IC) bilaterais de 95% associados.

Foram testadas 516 amostras com o ensaio TSO Comprehensive (UE) e/ou método ortogonal. Destas amostras, 499 foram testadas por ambos os métodos. Dezassete das 516 amostras não foram testadas com um dos ensaios, devido a extração falhada, motivo desconhecido (para o método ortogonal) ou desvio do protocolo. Das 499 amostras testadas por ambos os métodos, 170 (34,1%) eram amostras do ensaio com larotrectinib e 329 (65,9%) eram amostras suplementares.

É mostrada uma tabela cruzada de resultados, para as 499 amostras, na [Tabela 81](#). Das 499 amostras, 85 tinham resultados de ensaio TSO Comprehensive (UE) inválidos; destas 85, 53 tinham também resultados de método ortogonal inválidos. Mais 7 amostras apresentaram resultados inválidos do método ortogonal. Assim, 407 das 499 amostras tiveram resultados válidos por ambos os métodos.

Tabela 81 Estudo de precisão NTRK: Tabulação cruzada do resultado TSO Comprehensive (UE) versus resultado do método ortogonal para deteção de fusão NTRK

Resultado do ensaio TSO Comprehensive (UE)	Resultado do método ortogonal			Total
	Fusão positiva de NTRK	Fusão negativa de NTRK	Inválido	
Fusão positiva de NTRK	114	16	1	131
Fusão negativa de NTRK	4	273	6	283
Inválidos*	4	28	53	85
Total	122	317	60	499

\* Os resultados inválidos do ensaio TSO Comprehensive (UE) provêm da amostra e do nível de ensaio.

As análises de concordância, excluindo e incluindo resultados inválidos de ensaios TSO Comprehensive (UE), são apresentadas na [Tabela 82](#). Excluindo resultados inválidos do ensaio TSO Comprehensive (UE), a PPA foi de 96,6% (114/118; IC de 95%: 91,5% – 99,1%) e a NPA foi de 94,5% (273/289; IC de 95%: 91,2% – 96,8%).



Tabela 82 Estudo de precisão NTRK: PPA e NPA do ensaio TSO Comprehensive (UE) em comparação com o resultado do método ortogonal para detetar fusões de NTRK

Indicador de concordância	Excluindo resultados de ensaio TSO Comprehensive (UE) inválidos		Incluindo resultados de ensaio TSO Comprehensive (UE) inválidos	
	Concordância, % (n/N)	IC* de 95%	Concordância, % (n/N)	IC* de 95%
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%

\* IC de 95% com base no método de Clopper-Pearson (exato).

## Estudo clínico de transposição para deteção de fusões de NTRK1, NTRK2, NTRK3

A validade clínica do ensaio TSO Comprehensive (UE) para detetar fusões de NTRK1, NTRK2 ou NTRK3 em doentes com tumores sólidos, que podem beneficiar do tratamento com larotrectinib, foi demonstrada num estudo clínico de transposição. O estudo foi realizado para avaliar a eficácia clínica do ensaio TSO Comprehensive (UE) para identificar doentes positivos para fusão de NTRK1, NTRK2 ou NTRK3 para tratamento com larotrectinib e para avaliar a concordância entre o ensaio TSO Comprehensive (UE) e os métodos locais de teste (LT) (utilizados para determinar o estado de fusão de NTRK para os ensaios clínicos com larotrectinib).

Os métodos LT incluíram ensaios NGS, hibridação fluorescente in situ (FISH), reação em cadeia da polimerase (PCR) e NanoString. As fusões de NTRK (ETV6 NTRK3) foram inferidas para doentes com fibrossarcoma infantil que tinham uma translocação ETV6 documentada identificada por FISH. A maioria dos 235 doentes do ensaio com larotrectinib, com estado de fusão de NTRK conhecido, tinha sido testada por métodos NGS.

Os estudos NAVIGATE NCT02576431 e SCOUT NCT02637687 encontram-se ainda em fase de inclusão. Até a data limiar de dados de 15 de julho de 2019, foram incluídos 279 doentes. Dos 279 doentes, 208 acusaram fusão positiva de NTRK. Dos 208 doentes positivos, 164 formaram o larotrectinib ePAS4.

O critério de avaliação primário para a análise de eficácia de larotrectinib foi a taxa de resposta objetiva (ORR), de acordo com a avaliação da comissão de revisão independente (IRC), num conjunto de dados agrupados dos 3 estudos clínicos. A ORR foi avaliada com base na proporção de doentes com melhor resposta objetiva de respostas completas confirmadas ou respostas parciais confirmadas, com base nos critérios RECIST, versão 1.1. A ORR no larotrectinib ePAS4 foi de 72,6% (IC de 95% [65,1%, 79,2%]) e incluiu doentes com 16 tipos de tumor diferentes.

## Contabilização de amostras

O conjunto de amostras incluiu a representação de uma vasta gama de tipos de tumores e amostras de doentes pediátricos e adultos.

Foram incluídos 279 doentes nos estudos com larotrectinib a partir de 15 de julho de 2019. Destes, 235 doentes tinham estado conhecido de fusão de NTRK, conforme determinado por um método de LT: 208 eram positivos e 27 eram negativos. Para 44 doentes, o estado de fusão de NTRK era desconhecido, uma vez que não eram necessários testes para a elegibilidade dos doentes, nas fases de escalonamento da dose dos estudos

NCT02122913 e SCOUT NCT02637687. Para o estudo clínico de transposição do ensaio TSO Comprehensive (UE), foram elegíveis para este estudo amostras de doentes do ensaio larotrectinib, incluídos a partir de 15 de julho de 2019 com estado conhecido de fusão de NTRK (208 doentes positivos e 27 doentes negativos) e as amostras suplementares determinadas como sendo para fusão negativa de NTRK por métodos de LT representativos.

Das 208 amostras positivas do ensaio com larotrectinib, 154 tinham uma amostra disponível para testes de ensaio TSO Comprehensive (UE). Destes, 138 tinham resultados válidos. Quinze amostras eram inválidas devido a uma falha nas indicadores de qualidade da sequenciação da amostra e 1 amostra não foi testada devido a um desvio ao protocolo. Das 27 amostras negativas do ensaio com larotrectinib, 24 tinham uma amostra disponível para teste. Destas, 22 tinham resultados válidos do ensaio TSO Comprehensive (UE). Duas amostras eram inválidas devido a uma falha nas indicadores de qualidade da sequenciação de amostras.

Foram rastreadas amostras suplementares utilizando um de dois métodos de LT representativos. Mais de 350 amostras foram obtidas e examinadas, quanto ao conteúdo tumoral. Das amostras suplementares que cumprem os requisitos da amostra, 266 foram extraídas com sucesso e confirmadas como fusão negativa de NTRK por um método de LT representativo. Destas amostras, 260 estavam disponíveis para testes do ensaio TSO Comprehensive (UE), dos quais 222 tinham resultados válidos. Existiam 38 amostras que eram inválidas devido à falha nos indicadores de sequenciação de amostras (n = 25) ou à falha de sequenciação de ensaio (n = 13). O conjunto total de fusão negativa de NTRK foi composto por 222 amostras suplementares e 22 amostras do ensaio com larotrectinib.

## Resultados de concordância

A concordância dos resultados do TSO Comprehensive (UE), relativamente aos resultados dos métodos LT, com e sem resultados inválidos do TSO Comprehensive (UE), é apresentada na [Tabela 83](#).

**Tabela 83** Estudo clínico de transposição NTRK: Concordância entre o ensaio TSO Comprehensive (UE) e os métodos LT para deteção de fusões de NTRK

Indicador de concordância	Excluindo resultados inválidos do ensaio TSO Comprehensive (UE)		Incluindo resultados inválidos do ensaio TSO Comprehensive (UE)	
	% de concordância (n/N)	IC* de 95%	% de concordância (n/N)	IC* de 95%
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%

\* Os IC de 95% bilaterais foram calculados utilizando o método de Clopper-Pearson (exato).

A análise de sensibilidade, em relação aos resultados em falta do ensaio TSO Comprehensive (UE), demonstrou a robustez da análise de concordância. Os resultados em falta do ensaio TSO Comprehensive (UE), para os doentes com fusão positiva de NTRK em LT (n = 70), foram imputados utilizando um modelo de regressão logística. As estimativas de concordância, incluindo os valores imputados, são apresentadas na [Tabela 84](#).

Tabela 84 Estudo clínico de transposição NTRK: Concordância entre o ensaio TSO Comprehensive (UE) e os métodos de LT para detecção de fusões positivas de NTRK, incluindo valores imputados a doentes com LT positivos, com resultados em falta do ensaio TSO Comprehensive (UE)

Indicador de concordância	% de concordância	IC* de 95%
PPA	85,2%	78,6% – 91,7%
NPA	96,3%	93,9% – 98,7%
OPA	91,2%	87,9% – 94,5%

Os resultados em falta do ensaio TSO Comprehensive (UE) de doentes negativos para fusão LT não foram imputados.

\* Os IC de 95% bilaterais foram calculados com base no método de arranque com imputação múltipla. O método de arranque com imputação múltipla é uma técnica de estimativa de variância assente na imputação múltipla (Schomaker e Heumann 2018).

As concordâncias entre o ensaio TSO Comprehensive (UE) e os LT por tipo de método (por exemplo, NGS de ARN, FISH) são apresentadas na [Tabela 85](#).

Tabela 85 Estudo clínico de transposição NTRK: Concordância entre o ensaio TSO Comprehensive (UE) e os métodos LT para detecção de fusões de NTRK, por tipo de método LT

Tipo de método LT	Medida de concordância	% de concordância (n/N)	IC de 95% <sup>1</sup>
NGS de ADN	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%
NGS de ARN <sup>2</sup>	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	Não calculado (1/1)	Não calculado
	OPA	81,8% (9/11)	48,2% – 97,7%
PCR	PPA	100,0% (8/8)	63,1% – 100,0%
	NPA	Não calculado (0/0)	Não calculado
	OPA	100,0% (8/8)	63,1% – 100,0%

Não calculado: para subgrupos com contagem de amostras < 5, as estatísticas de concordância não foram calculadas.

<sup>1</sup> Os IC de 95% bilaterais foram calculados utilizando o método de Clopper-Pearson (exato).

<sup>2</sup> Inclui métodos de NGS que utilizam apenas ARN e ambos ADN e ARN.

Das 437 amostras testadas com o ensaio TSO Comprehensive (UE), 24 apresentaram resultados discordantes com os LT: 15 foram positivas nos LT e negativas no ensaio TSO Comprehensive (UE) e 9 foram negativas nos LT e positivas no ensaio TSO Comprehensive (UE). Das 24 amostras com resultados discordantes, 8 foram testadas com um método de NGS LT de ADN, 14 com um método de NGS LT de ARN e 2 com a FISH.

Um método de NGS independente validado confirmou os resultados do ensaio TSO Comprehensive (UE), em 14 das 24 amostras com resultados discordantes. Para as restantes 10 amostras, os resultados do ensaio TSO Comprehensive (UE) foram discordantes com os métodos de LT e de NGS independente.

## Resultados de eficácia clínica

Dentro da coorte ePAS4, a eficácia de larotrectinib na população positiva, positiva para LT do TSO Comprehensive (UE) (97 doentes, ORR = 78,4%, IC de 95% [68,8%, 86,1%]) foi semelhante à eficácia de larotrectinib na população total ePAS4 (164 doentes, ORR = 72,6%, IC de 95% [65,1%, 79,2%]) (Tabela 86). Dos 97 doentes positivos do TSO Comprehensive (UE) no ePAS4, 28 (28,9%) doentes alcançaram uma resposta completa/resposta completa cirúrgica e 48 (49,5%) doentes alcançaram uma resposta parcial.

Das 13 populações negativas, positivas para LT do TSO Comprehensive (UE), 1 (7,7%) apresentou uma resposta completa e 2 (15,4%) apresentaram uma resposta parcial, com a terapêutica com larotrectinib.

Tabela 86 Estudo clínico de transposição NTRK: ORR para doentes positivos para LT por LT e resultados em ePAS4 do TSO Comprehensive (UE)

		Fusão LT positiva N = 164	TSO Comprehensive (UE) Positivo e LT positivo N = 97	TSO Comprehensive (UE) Negativo e LT positivo N = 13
<b>Melhor resposta objetiva, n (%)</b>	Resposta completa	31 (18,9%)	22 (22,7%)	1 (7,7%)
	Resposta completa cirúrgica	8 (4,9%)	6 (6,2%)	0
	Resposta parcial	80 (48,8%)	48 (49,5%)	2 (15,4%)
	Doença estável	25 (15,2%)	13 (13,4%)	4 (30,8%)
	Doença progressiva	13 (7,9%)	6 (6,2%)	5 (38,5%)
	Não avaliável	7 (4,3%)	2 (2,1%)	1 (7,7%)
<b>Taxa de resposta objetiva</b>	Número de doentes, n	164	97	13
	Número de doentes com CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (IC* de 95%)	72,6% (65,1%, 79,2%)	78,4% (68,8%, 86,1%)	23,1% (5,0%, 53,8%)

Abreviaturas: CR = resposta completa, PR = resposta parcial, sCR = resposta completa cirúrgica.

\* O intervalo de confiança bilateral de 95% foi calculado utilizando o método de Clopper-Pearson (exato).

54 doentes têm resultados em falta do ensaio TSO Comprehensive (UE).

Os dados deste estudo apoiam a segurança e eficácia do ensaio TSO Comprehensive (UE), quando utilizado para identificar doentes com tumores sólidos com fusões de NTRK, que possam ser elegíveis para tratamento com larotrectinib.

## Referências

1. Sociedade Americana de Oncologia Clínica. [www.asco.org](http://www.asco.org). Acedido a 3 de outubro de 2016.
2. Sociedade Europeia de Oncologia Médica. [www.esmo.org](http://www.esmo.org). Acedido a 3 de outubro de 2016.

## Histórico de revisões

Revisão	Data	Descrição da alteração
v06	Fevereiro 2023	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Declarações adicionais na secção Limitações</li> <li>• Atualizações de idioma para convenção, gramática e clareza</li> <li>• Correção das tabelas 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72</li> <li>• Declaração sobre a presença de precipitados no reagente de FSM</li> <li>• Especificações atualizadas do termociclador e da cuba na lista do equipamentos e materiais</li> </ul>
v05	Setembro de 2022	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionado módulo de análise ao TSO Comprehensive PN v2.3.5</li> <li>• Módulo de análise do TSO Comprehensive PN v2.3.3 removido</li> <li>• Atualizada terminologia na secção Limite de branco</li> </ul>
v04	Junho 2022	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicionado módulo de análise ao TSO Comprehensive PN v2.3.5</li> <li>• Módulo de análise do TSO Comprehensive PN v2.3.3 removido</li> <li>• Atualizada terminologia na secção Limite de branco</li> </ul>
v03	Abril 2022	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adição de informações sobre características de desempenho relacionadas com fusões de NTRK</li> <li>• Adicionada marcação APENAS PARA EXPORTAÇÃO</li> <li>• Declaração de utilização prevista atualizada para adicionar o pedido NTRK1-3 CDx</li> <li>• Informação expandida dos componentes do produto para incluir PN dos componentes do software</li> </ul>
v02	Fevereiro 2022	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erro de referência da tabela corrigido</li> <li>• Adição de limitação relacionada com variantes germinativas e somáticas</li> <li>• Esclarecimento da linguagem em torno da deteção de amplificação genética</li> </ul>
v01	Dezembro de 2021	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitações atualizadas do procedimento</li> <li>• Esclarecimento das especificações do suporte magnético e termociclador, nas listas de equipamentos e materiais</li> </ul>
v00	Novembro de 2021	Edição inicial

## Patentes e marcas comerciais

Este documento e respetivo conteúdo são propriedade da Illumina, Inc. e das suas afiliadas (“Illumina”) e destinam-se unicamente a utilização contratual por parte dos clientes relativamente à utilização dos produto(s) descritos no presente documento e para nenhum outro fim. Este documento e respetivo conteúdo não podem ser utilizados ou distribuídos para qualquer outro fim e/ou de outra forma transmitidos, divulgados ou reproduzidos por qualquer via, seja de que natureza for, sem a autorização prévia por escrito da Illumina. A Illumina não concede qualquer licença ao abrigo da sua patente, marca comercial, direito de autor ou direitos de jurisprudência nem direitos semelhantes de quaisquer terceiros por via deste documento.

As instruções contidas neste documento têm de ser estrita e explicitamente seguidas por pessoal qualificado e com a devida formação para garantir a utilização adequada e segura dos produto(s) aqui descritos. Todo o conteúdo deste documento tem de ser integralmente lido e compreendido antes da utilização dos referidos produto(s).

A NÃO OBSERVÂNCIA DA RECOMENDAÇÃO PARA LEITURA INTEGRAL E SEGUIMENTO EXPLÍCITO DE TODAS AS INSTRUÇÕES AQUI CONTIDAS PODE RESULTAR EM DANOS NO(S) PRODUTO(S), LESÕES EM PESSOAS, INCLUINDO NOS UTILIZADORES OU OUTROS, E EM DANOS MATERIAIS, E IRÁ ANULAR QUALQUER GARANTIA APLICÁVEL AO(S) PRODUTO(S).

A ILLUMINA NÃO ASSUME QUALQUER RESPONSABILIDADE RESULTANTE DA UTILIZAÇÃO INADEQUADA DOS PRODUTO(S) AQUI DESCRITOS (INCLUINDO PARTES DOS MESMOS OU DO SOFTWARE).

© 2023 Illumina, Inc. Todos os direitos reservados.

Todas as marcas comerciais são propriedade da Illumina, Inc. ou dos respetivos proprietários. Para obter informações específicas sobre marcas comerciais, consulte [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Informações de contacto



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, Califórnia 92122 EUA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (fora da América do Norte)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



## Etiquetas do produto

Para uma referência completa de símbolos que constam da embalagem e das etiquetas do produto, consulte a chave de símbolos em [support.illumina.com](http://support.illumina.com) no separador *Documentação* do seu kit.