

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Pakkausseloste

IN VITRO -DIAGNOSTISEEN KÄYTTÖÖN. VAIN VIENTIIN.

Suunniteltu käyttötarkoitus

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

Testi on tarkoitettu kytkö diagnostiikaksi, jonka avulla tunnistetaan syöpäpotilaat, jotka soveltuvat [Taulukko 1](#) luetelluilla kohdennetuilla hoidoilla hoidettaviksi hoitotuotteen hyväksytyjen merkintöjen mukaisesti. Lisäksi testi on tarkoitettu tarjoamaan kasvaimen profiilointitietoa päteville terveydenhuollon ammattilaisille ammattilaistason suuntaviivojen mukaisesti, eikä se ole sitova eikä ohjaava minkään tietyn hoitotuotteen merkintöjen mukaiseen käyttöön.

Taulukko 1 Kytkö diagnostiikan käyttöaihe

| Kasvaimen tyyppi | Biomarkkerit | Kohdennettu hoito |
|--------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| Kiinteät kasvaimet | NTRK1, NTRK2 ja NTRK3 Geenifuusiot | VITRAKVI® (larotreklinibi) |

Määrittämisen yhteenveto ja selitys

Kliininen kuvaus

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

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

Varianttitunnistuksen ulkopuolelle jätetyt alueet luetellaan *TruSight Oncology Comprehensive Block List (asiakirjanumero 200009524)* -estoluettelossa, joka on saatavilla Illumina-tukisivustolta. Joissain tiedostoissa estoluettelosta käytetään nimitystä musta lista.

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

Taulukko 2 TSO Comprehensive (EU) -analyysin geenipaneeli

| Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi |
|-----|---------------|----------|-----------------|-----|---------------|-------|-----------------|-----|---------------|----------|-----------------|
| 1 | 25 | ABL1 | S | 176 | 2261 | FGFR3 | S, F | 351 | 7849 | PAX8 | S |
| 2 | 27 | ABL2 | S | 177 | 2264 | FGFR4 | S | 352 | 55193 | PBRM1 | S |
| 3 | 84142 | ABRAXAS1 | S | 178 | 2271 | FH | S | 353 | 5133 | PDCD1 | S |
| 4 | 90 | ACVR1 | S | 179 | 201163 | FLCN | S | 354 | 80380 | PDCD1LG2 | S |
| 5 | 91 | ACVR1B | S | 180 | 2313 | FLI1 | S | 355 | 5156 | PDGFRA | S |
| 6 | 25960 | ADGRA2 | S | 181 | 2321 | FLT1 | S | 356 | 5159 | PDGFRB | S |
| 7 | 207 | AKT1 | S | 182 | 2322 | FLT3 | S | 357 | 5163 | PDK1 | S |
| 8 | 208 | AKT2 | S | 183 | 2324 | FLT4 | S | 358 | 5170 | PDPK1 | S |

| Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi |
|-----|---------------|---------|-----------------|-----|---------------|-----------|-----------------|-----|---------------|---------|-----------------|
| 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 | 3 020 | H3F3A | S | 384 | 5520 | PPP2R2A | S |
| 35 | 580 | BARD1 | S | 210 | 3021 | H3F3B | S | 385 | 5537 | PPP6C | S |
| 36 | 27113 | BBC3 | S | 211 | 440093 | H3F3C | S | 386 | 639 | PRDM1 | S |
| 37 | 8915 | BCL10 | S | 212 | 3082 | HGF | S | 387 | 80243 | PREX2 | S |
| 38 | 596 | BCL2 | S, F | 213 | 3006 | HIST1H1C | S | 388 | 5573 | PRKAR1A | S |
| 39 | 598 | BCL2L1 | S | 214 | 3017 | HIST1H2BD | S | 389 | 5584 | PRKCI | S |
| 40 | 10018 | BCL2L11 | S | 215 | 8350 | HIST1H3A | S | 390 | 5591 | PRKDC | S |
| 41 | 599 | BCL2L2 | S | 216 | 8358 | HIST1H3B | S | 391 | 5071 | PRKN | S |
| 42 | 604 | BCL6 | S | 217 | 8352 | HIST1H3C | S | 392 | 5652 | PRSS8 | S |
| 43 | 54880 | BCOR | S | 218 | 8351 | HIST1H3D | S | 393 | 5727 | PTCH1 | S |
| 44 | 63035 | BCORL1 | S | 219 | 8353 | HIST1H3E | S | 394 | 5728 | PTEN | S |
| 45 | 613 | BCR | S | 220 | 8968 | HIST1H3F | S | 395 | 5781 | PTPN11 | S |
| 46 | 330 | BIRC3 | S | 221 | 8355 | HIST1H3G | S | 396 | 5789 | PTPRD | S |
| 47 | 641 | BLM | S | 222 | 8357 | HIST1H3H | S | 397 | 5802 | PTPRS | S |

| Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi |
|-----|---------------|--------|-----------------|-----|---------------|----------|-----------------|-----|---------------|---------|-----------------|
| 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 | INHHA | S | 422 | 6016 | RIT1 | S |
| 73 | 1019 | CDK4 | S | 248 | 3624 | INHBA | S | 423 | 54894 | RNF43 | S |
| 74 | 1021 | CDK6 | S | 249 | 3631 | INPP4A | S | 424 | 6098 | ROS1 | S, F |
| 75 | 1024 | CDK8 | S | 250 | 8821 | INPP4B | S | 425 | 8986 | RPS6KA4 | S |
| 76 | 1026 | CDKN1A | S | 251 | 3643 | INSR | S | 426 | 6198 | RPS6KB1 | S |
| 77 | 1027 | CDKN1B | S | 252 | 3660 | IRF2 | S | 427 | 6199 | RPS6KB2 | S |
| 78 | 1029 | CDKN2A | S | 253 | 3662 | IRF4 | S | 428 | 57521 | RPTOR | S |
| 79 | 1030 | CDKN2B | S | 254 | 3667 | IRS1 | S | 429 | 861 | RUNX1 | S |
| 80 | 1031 | CDKN2C | S | 255 | 8660 | IRS2 | S | 430 | 862 | RUNX1T1 | S |
| 81 | 1050 | CEBPA | S | 256 | 3716 | JAK1 | S | 431 | 23429 | RYBP | S |
| 82 | 1058 | CENPA | S | 257 | 3717 | JAK2 | S | 432 | 6389 | SDHA | S |
| 83 | 1106 | CHD2 | S | 258 | 3718 | JAK3 | S | 433 | 54949 | SDHAF2 | S |
| 84 | 1108 | CHD4 | S | 259 | 3725 | JUN | S | 434 | 6390 | SDHB | S |
| 85 | 1111 | CHEK1 | S | 260 | 7994 | KAT6A | S | 435 | 6391 | SDHC | S |
| 86 | 11200 | CHEK2 | S | 261 | 5927 | KDM5A | S | 436 | 6392 | SDHD | S |

| Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi |
|-----|---------------|---------|-----------------|-----|---------------|---------|-----------------|-----|---------------|---------|-----------------|
| 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 |
| 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 |

| Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi |
|-----|---------------|--------|-----------------|-----|---------------|--------|-----------------|-----|---------------|----------|-----------------|
| 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 | TMPPRS2 | S, F |
| 140 | 54206 | ERRF1 | S | 315 | 4610 | MYCL | S | 490 | 7128 | TNFAIP3 | S |
| 141 | 2099 | ESR1 | S, F | 316 | 4613 | MYCN | S | 491 | 8764 | TNFRSF14 | S |
| 142 | 2113 | ETS1 | S | 317 | 4615 | MYD88 | S | 492 | 7150 | TOP1 | S |
| 143 | 2115 | ETV1 | S, F | 318 | 4654 | MYOD1 | S | 493 | 7153 | TOP2A | S |
| 144 | 2118 | ETV4 | S, F | 319 | 4665 | NAB2 | S | 494 | 7157 | TP53 | S |
| 145 | 2119 | ETV5 | S | 320 | 4683 | NBN | S | 495 | 8626 | TP63 | S |
| 146 | 2120 | ETV6 | S | 321 | 8202 | NCOA3 | S | 496 | 7186 | TRAF2 | S |
| 147 | 2130 | EWSR1 | S | 322 | 9611 | NCOR1 | S | 497 | 84231 | TRAF7 | S |
| 148 | 2146 | EZH2 | S | 323 | 257194 | NEGR1 | S | 498 | 7248 | TSC1 | S |
| 149 | 54855 | FAM46C | S | 324 | 4763 | NF1 | S | 499 | 7249 | TSC2 | S |
| 150 | 2175 | FANCA | S | 325 | 4771 | NF2 | S | 500 | 7253 | TSHR | S |
| 151 | 2176 | FANCC | S | 326 | 4780 | NFE2L2 | S | 501 | 7307 | U2AF1 | S |
| 152 | 2177 | FANCD2 | S | 327 | 4792 | NFKBIA | S | 502 | 7422 | VEGFA | S |
| 153 | 2178 | FANCE | S | 328 | 7080 | NKX2-1 | S | 503 | 7428 | VHL | S |
| 154 | 2188 | FANCF | S | 329 | 4824 | NKX3-1 | S | 504 | 79679 | VTCN1 | S |
| 155 | 2189 | FANCG | S | 330 | 4851 | NOTCH1 | S | 505 | 8838 | WISP3 | S |
| 156 | 55215 | FANCI | S | 331 | 4853 | NOTCH2 | S | 506 | 7490 | WT1 | S |
| 157 | 55120 | FANCL | S | 332 | 4854 | NOTCH3 | S | 507 | 331 | XIAP | S |
| 158 | 355 | FAS | S | 333 | 4855 | NOTCH4 | S | 508 | 7514 | XPO1 | S |
| 159 | 2195 | FAT1 | S | 334 | 4869 | NPM1 | S | 509 | 7516 | XRCC2 | S |
| 160 | 55294 | FBXW7 | S | 335 | 4893 | NRAS | S | 510 | 10413 | YAP1 | S |
| 161 | 2246 | FGF1 | S | 336 | 3084 | NRG1 | S, F | 511 | 7525 | YES1 | S |
| 162 | 2255 | FGF10 | S | 337 | 64324 | NSD1 | S | 512 | 57621 | ZBTB2 | S |
| 163 | 2259 | FGF14 | S | 338 | 4914 | NTRK1 | S, F | 513 | 51341 | ZBTB7A | S |
| 164 | 9965 | FGF19 | S | 339 | 4915 | NTRK2 | S, F | 514 | 463 | ZFH3 | S |

| Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi | Nro | Entrez-tunnus | Geeni | Varianttityyppi |
|-----|---------------|-------|-----------------|-----|---------------|-------|-----------------|------------|---------------|------------|-----------------|
| 165 | 2247 | FGF2 | S | 340 | 4916 | NTRK3 | S, F | 515 | 7764 | ZNF217 | S |
| 166 | 8074 | FGF23 | S | 341 | 9688 | NUP93 | S | 516 | 80139 | ZNF703 | S |
| 167 | 2248 | FGF3 | S | 342 | 256646 | NUTM1 | S | 517 | 8233 | ZRSR2 | S |
| 168 | 2249 | FGF4 | S | 343 | 5058 | PAK1 | S | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu |
| 169 | 2250 | FGF5 | S | 344 | 5063 | PAK3 | S | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu |
| 170 | 2251 | FGF6 | S | 345 | 57144 | PAK5 | S | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu |
| 171 | 2252 | FGF7 | S | 346 | 79728 | PALB2 | S | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu |
| 172 | 2253 | FGF8 | S | 347 | 142 | PARP1 | S | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu |
| 173 | 2254 | FGF9 | S | 348 | 5077 | PAX3 | S, F | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu |
| 174 | 2260 | FGFR1 | S, F | 349 | 5079 | PAX5 | S | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu |
| 175 | 2263 | FGFR2 | S, F | 350 | 5081 | PAX7 | S | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu | Ei sovellu |

Menetelmän periaatteet

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

TSO Comprehensive (EU) -määritys sisältää seuraavat prosessit.

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

sekvensointireadeja sekä laatupesteytykset ottamatta lukuun readeja klustereista, jotka eivät läpäisseet suodatinta. Sen jälkeen sekvensointireadit kohdistetaan referenssigenomiin, jotta voidaan tunnistaa sekvenssien välinen suhde ja määrittää pistemäärä samankaltaisten alueiden perusteella. Kohdistetut readit kirjoitetaan tiedostoihin BAM-muodossa. Määrittämisohjelmistossa käytetään erillisiä algoritmeja DNA- ja/tai RNA-näytteistä luoduille kirjastoille DNA:n pienten varianttien, geenin monistumisten, TMB:n ja DNA-näytteiden MSI:n sekä fuusioiden ja RNA-näytteiden silmukointivarianttien tunnistamiseksi.

Analyysiohjelmiston moduuli luo useita tuotoksia, muun muassa sekvensoinnin mittaustiedot ja varianttien tunnistusmuototiedostot (VCF). VCF-tiedostot sisältävät tietoa viitegenomin tietyistä asemista löytyneistä varianteista. Sekvensoinnin mittaustiedot ja yksittäiset tuotostiedostot luodaan kullekin näytteelle. Katso toissijaisen ja tertiäärin analyysin lisätietoja kohdasta *Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)*.

- **Tertiäärinen analyysi** – Tertiäärinen analyysi, joka suoritetaan Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -analyysimoduulilla, koostuu TMB- ja MSI-laskelmista, kytkösdiaagnostiikan tunnistuksesta, kasvaimen profiloitavarianteista kahdella kliinisen merkitsevyyden tasolla käyttäen tietokantaa (KB) ja kudostyyppiä, ja sen seurauksena luodaan raportti. Kasvaimen profilointiin voidaan myös viitata laajana genomiprofilointina. Tulkitut varianttitulokset sekä TMB- ja MSI-biomarkkeritulokset esitetään yhteenvetona TSO Comprehensive (EU) -tuloksetraportissa.

Menetelmän rajoitukset

Vain *in vitro* -diagnostiseen käyttöön.

- Käytettäväksi vain lääkärin määräyksestä. Testiä on käytettävä kliinisten laboratoriomääräysten mukaisesti.
- Käyttötarkoitusta koskevassa [Taulukko 2](#) luetellut genomilöydökset eivät ole ohjaavia tai sitovia minkään tietyn hoitotuotteen käyttöaiheen mukaiseen käyttöön.
- TSO Comprehensive (EU) -tuloksetraportin kohdassa Genomilöydökset, joissa on merkkejä kliinisestä merkittävydestä (Taso 2) ja Genomilöydökset, joilla on mahdollisesti kliinistä merkitystä (Taso 3), lueteltujen varianttien kohdalla ei ole suoritettu kliinistä validointia.
- Potilaan hoitoa koskevien päätösten täytyy perustua hoitavan lääkärin riippumattomaan lääkinnälliseen harkintaan, jossa otetaan huomioon kaikki potilaan tilaa koskevat sovellettavat tiedot, kuten potilaan ja potilaan suvun historia, lääkärintarkastukset, muista diagnostiikkatesteistä saadut tiedot sekä potilaan mieltymykset kyseisen yhteisön hoitostandardien mukaan.
- FFPE-näytelaadussa esiintyy runsaasti vaihtelua. Näytteet, joille ei käytetty fiksaation vakiotoimenpiteitä, eivät ehkä tuota uutettuja nukleinihappoja, jotka vastaavat määrityksen laadunvarmistusvaatimuksia ([Laadunvalvonta sivulla 79](#)). FFPE-näyteblokit, joita on säilytetty yli viisi vuotta kauemmin, ovat osoittaneet huonompaa validiteettia.
- TSO Comprehensive (EU) -suorituskykyä ei ole arvioitu sellaisilta potilailta saatujen näytteiden kohdalla, joille on tehty elin- tai kudossiirto.
- Suuri määrä nekroottista kudosta ($\geq 25\%$) voi häiritä TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kykyä havaita geenin monistumisia ja RNA-fuusioita.

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

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

Taulukko 3 Nukleotidimuutokset kolmen RET-variantin osalta

| Aminohappomuutos | Krom. | Sijainti | Viitealleeli | Vaihtoehtoinen |
|--------------------------|-------|----------|-----------------------------|----------------------------------------------------------|
| p.E632_ A640delinsVRP | chr10 | 43609943 | AGCTGTGCCCGCACGGTGATCGCAGCC | TAAGGCCG TGCGGCCG |
| p.E632_ C634delinsDVR | chr10 | 43609944 | GCTGTGC | TGTCAGG |
| p.C634_ R635insPK | chr10 | 43609952 | GC | CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG |

Chr = kromosomi

Tuotteen osat

TSO Comprehensive (EU) -testi koostuu seuraavista komponenteista:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) -sarja (Illumina -luettelonumero 20063092) – Sarja sisältää reagenssit, joiden määrä on riittävä 24:n DNA- ja 24:n RNA-kirjaston luomiseen. Näihin sisältyvät potilasnäytteet ja kontrollit. Kontrollit myydään erikseen (katso [Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit sivulla 18](#)).
- Tietokanta: Päivitetään säännöllisesti ja ladattavissa Illumina Lighthouse -portaalista.
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Illumina-luettelonumero 20051843*), joka sisältää seuraavat komponentit ja tukee kasvaimen profilointia ja NTRK:tä:
 - Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.3.0 (PN 20109338)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.7 -ohjelmistopaketti (PN 20116450)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.7 + Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.3.0 USB-sarja (PN 20116451)
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module (Illumina-luettelonumero 20051843*), joka sisältää seuraavat komponentit ja tukee kasvaimen profilointia ja NTRK:tä:
 - Claims Packages TSO Comprehensive (EU) v2.0.0 (PN 20051760)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 -ohjelmistopaketti (PN 20075244)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 -USB-pakkaus (PN 20075239).

* Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module: Illumina-huoltoedustaja asentaa sopivan TSO Comprehensive (EU) -analyysimoduuli -version Local Run Manager NextSeq 550Dx -laitteeseen. Katso työnkulun opas ja analyysimoduulin ohjelmistoversio kohdasta [Taulukko 4](#)eseen.

Taulukko 4 Työnkulkuopas TSO Comprehensive Analysis Module Software -versiolle

| Työnkulkuopas | Kudos | TSO Comprehensive -ohjelmistoversio |
|---------------|-------|-------------------------------------|
| 200008661 | FFPE | v2.3.5 tai v2.3.7 |

Reagenssit

Mukana tulevat reagenssit

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

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

| Reagenssi | Osanumero | Määrä | Tilavuus | Aktiiviset ainesosat | Säilytyslämpötila |
|----------------------------------|-----------|-------|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| First Strand Synthesis Mix (FSM) | 20031431 | 1 | 260 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja nukleotideja | -25 °C – -15 °C |
| Second Strand Mix (SSM) | 20031432 | 1 | 720 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, DNA-polymeraasia, RNAaasi H:ta ja nukleotideja | -25 °C – -15 °C |
| Elution Primer Frag Mix (EPH3) | 20031433 | 1 | 250 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja satunnaisia heksameerejä | -25 °C – -15 °C |
| Reverse Transcriptase (RVT) | 20031434 | 1 | 70 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää käänteiskopioijaentsyymiä | -25 °C – -15 °C |

TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze), PN 20031118

| Reagenssi | Osanumero | Määrä | Tilavuus | Aktiiviset ainesosat | Säilytyslämpötila |
|----------------------------------|-----------|-------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| End Repair A-tailing A (ERA1-A) | 20031435 | 2 | 85 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää T4-DNA-polymeraasia ja polynukleotidikinaasia | -25 – -15 °C |
| End Repair A-tailing B (ERA1-B) | 20031436 | 2 | 210 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja nukleotideja | -25 – -15 °C |
| Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1) | 20031437 | 2 | 1,73 ml | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja | -25 – -15 °C |
| DNA Ligase 3 (LIG3) | 20031438 | 2 | 190 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää ligaasia | -25 – -15 °C |

| Reagenssi | Osanumero | Määrä | Tilavuus | Aktiiviset ainesosat | Säilytyslämpötila |
|-----------------------------------|-----------|-------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Short Universal Adapters 1 (SUA1) | 20031439 | 1 | 290 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yleiskäyttöisiä sekvensointioligonukleotideja | -25 – -15 °C |
| UMI Adapters v1 (UMI) | 20031496 | 1 | 290 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää yleiskäyttöisiä sekvensointioligonukleotideja | -25 – -15 °C |
| Stop Ligation Buffer (STL) | 20031440 | 2 | 480 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja | -25 – -15 °C |
| Enhanced PCR Mix (EPM) | 20031441 | 2 | 550 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää DNA-polymeraasia ja nukleotideja | -25 – -15 °C |

TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate), PN 20031119

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

TruSight Oncology Comp UP -indeksialukkeet, PN 20031120

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

**HUOMIO**

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

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

TruSight Oncology Comp CP -indeksialukkeet, PN 20031126

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

**HUOMIO**

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

| Indeksialuke | Osanumero | Määrä | Tilavuus | i7- indeksi | Sekvenssi | i5- indeksi | Sekvenssi | Säilytyslämpötila |
|--------------|-----------|-------|----------|----------------|-----------|----------------|-----------|-------------------|
| CP01 | 20031461 | 1 | 20 µl | D721 | CATCGAGG | D507 | ACGTCCTG | -25 °C – -15 °C |
| CP02 | 20031462 | 1 | 20 µl | D723 | CTCGACTG | D508 | GTCAGTAC | -25 °C – -15 °C |
| CP03 | 20031463 | 1 | 20 µl | D709 | CGGCTATG | D519 | CCGTCGCC | -25 °C – -15 °C |
| CP04 | 20031464 | 1 | 20 µl | D711 | TCTCGCGC | D520 | GTCCGAGG | -25 °C – -15 °C |

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

TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate), PN 20031123

| Reagenssi | Osanumero | Määrä | Tilavuus | Aktiiviset ainesosat | Säilytyslämpötila |
|-----------------------------------------------|-----------|-------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Target Capture Buffer 1 (TCB1) | 20031477 | 2 | 870 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää formamidia ja suoloja | 2 °C – 8 °C |
| Streptavidin Mag Beads (SMB) | 20031478 | 2 | 7,78 ml | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja ja kiinteän faasin paramagneettisia helmiä, jotka on kovalettisesti pinnoitettu streptavidiinilla | 2 °C – 8 °C |
| 2N NaOH (HP3) | 20031479 | 2 | 400 µl | Natriumhydroksidiliuos | 2 °C – 8 °C |
| Elute Target Buffer 2 (ET2) | 20031480 | 2 | 290 µl | Puskuroitu vesiliuos | 2 °C – 8 °C |
| Library Normalization Beads 1 (LNB1) | 20031481 | 1 | 1,04 ml | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää kiinteän faasin paramagneettisia helmiä | 2 °C – 8 °C |
| Library Normalization Wash 1 (LNW1) | 20031482 | 2 | 4,8 ml | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, 2-merkptoetanolia ja formamidia | 2 °C – 8 °C |
| Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1) | 20031483 | 2 | 3,5 ml | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja | 2 °C – 8 °C |

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

TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze), PN 20031121

| Reagenssi | Osanumero | Määrä | Tilavuus | Aktiiviset ainesosat | Säilytyslämpötila |
|------------------------------------------|-----------|-------|----------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Target Capture Additives 1 (TCA1) | 20031486 | 2 | 521 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää oligonukleotideja | -25 °C – -15 °C |
| Enhanced Enrichment Wash (EEW) | 20031487 | 1 | 50,4 ml | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja | -25 °C – -15 °C |
| Enrichment Elution 2 (EE2) | 20031488 | 3 | 1,65 ml | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää detergenttiä | -25 °C – -15 °C |
| Enhanced PCR Mix (EPM) | 20031441 | 2 | 550 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää DNA-polymeraasia ja nukleotideja | -25 °C – -15 °C |
| PCR Primer Cocktail 3 (PPC3) | 20031490 | 2 | 150 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää P5- ja P7-alukkeita | -25 °C – -15 °C |
| Library Normalization Additives 1 (LNA1) | 20031491 | 1 | 4,6 ml | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää suoloja, 2-merkaptotetanolia ja formamidia | -25 °C – -15 °C |
| PhiX Internal Control (PX3 tai PhiX) | 20031492 | 1 | 10 µl | Puskuroitu vesiliuos, joka sisältää PhiX-genomi-DNA:ta | -25 °C – -15 °C |

TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

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

Erikseen hankittavat pakolliset reagenssit

Monistusta edeltävät reagenssit

- DNA:n ja RNA:n uutto- ja puhdistusreagenssit – katso reagenssivaatimukset kohdasta [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26](#)
- DNA- ja RNA-kvantifiointireagenssit – katso reagenssivaatimukset kohdasta [Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26](#)
- TruSight Oncology -kontrollit:
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina-luettelonumero 20065041)
 - TruSight Oncology DNA Control (Illumina-luettelonumero 20065042)
- Etanoli (EtOH), 100 % (200 proof-yksikköä), molekyylibiologialaatuinen
- RNAasiton/DNAasiton-vesi

Monistuksen jälkeiset reagenssit

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 sykliä) (Illumina-luettelonumero 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykliä)
- EtOH, 100 % (200 proof-yksikköä), molekyylibiologialaatuinen
- RNAasiton/DNAasiton-vesi

Reagenssin säilytys ja käsittely

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

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

**HUOMIO**

Älä säilytä reagensseja automaattisen sulatusjärjestelmän omaavassa säilytysyksikössä tai jääkaapin ovilokeroissa.

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

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

**HUOMIO**

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

- Reagenssien fyysisen ulkoasun muutos voi olla osoitus materiaalien huononemisesta. Jos ilmenee fyysisen ulkoasun muutoksia (kuten reagenssin värin muutoksia tai sameutta), älä käytä reagensseja.
- FSM:ssä, SSM:ssä, ERA1-B:ssä ja TCB1:ssä voi olla tuotteeseen liittyviä hiukkasia. Noudata kunkin reagenssin käsittelyohjeita. FSM:n ja SSM:n sekoitusvaiheiden jälkeen jäljelle jääneet valkoiset tuotteeseen liittyvät hiukkaset eivät vaikuta suorituskyykyyn.
- TSO Comprehensive (EU) -määrityksen stabiilius on arvioitu ja sen suorituskyyky on osoitettu enintään neljälle pakkauksen käyttökerralle. Reagenssit ovat stabiileja, kun niitä säilytetään ilmoitetuissa lämpötiloissa laatikon etiketissä mainittuun viimeiseen käyttöpäivään asti.

Välineet ja materiaalit

Tarvittavat välineet ja materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Monistusta edeltävät välineet ja materiaalit

| Välineet | Toimittaja |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Ultrasonikaattori ja siihen liittyvät varusteet Katso Ultrasonikaattorin määritykset DNA-fragmentointia varten sivulla 23 . | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| PCR-laite, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> Lämmitetty kansi, jonka voi asettaa 30 °C:seen ja 100 °C:seen (tai kytkeä pois päältä, jos ei voi asettaa 30 °C:seen) Kattaa lämpötila-alueen 4 °C – 99 °C ±0,25 °C:n lämpötilatarkkuus Yhteensopiva 96-kuoppaisten PCR-levyjen kanssa, 0,2 ml Katso PCR-laitteen nousunopeus sivulla 24 | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Vorteksointilaite | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Mikronäyteinkubaattorit (2) 96-kuoppaisten MIDI-levyjen (2) sisäosilla | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Mikrosentrifugi | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Sentrifugi (levysentrifugi), jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> 96-kuoppaisten mikrolevyjen sentrifugointi 280 × g | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Levyravistin, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> 2 mm:n rata Mahdollisuus ravistaa nopeudella 1 200 rpm ja 1 800 rpm | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Tiivistyskiila tai -tela | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Magneettinen jalusta, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> Suunniteltu paramagneettisten helmien saostamiseen/erotukseen Magneetit jalustan sivuilla, ei pohjassa 96-kuoppaisille MIDI-levyille | Yleinen laboratoriotoimittaja |

| Välineet | Toimittaja |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| Tarkkuuspipetit, jotka pystyvät annostelevaan tarkasti 2 – 1 000 µl:n tilavuudet seuraavin määrittäisin: <ul style="list-style-type: none"> • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,02 ml • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,1 ml, 0,2 ml tai 0,5 ml • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 1 µl tai 2 µl Pipetit on kalibroitava säännöllisesti ja niiden on oltava tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta. | Yleinen laboratoriotuottaja |
| Pipetointiväline | Yleinen laboratoriotuottaja |
| Jää- tai kylmäblokki | Yleinen laboratoriotuottaja |
| 10 ml:n serologisia pipettejä | Yleinen laboratoriotuottaja |
| 96-kuoppalevyjen liimapintaiset sulkukannet, joilla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Irrotettava • Sopiva "skirted"- tai "semiskirted"-tyypin PCR-levyille • Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilavaihteluja -20°C – 100°C • DNAasiton/RNAasiton | Yleinen laboratoriotuottaja |
| Mikrosentrifugiputket, joiden kapasiteetti on 1,7 ml, nukleaasittomat | Yleinen laboratoriotuottaja |
| Nukleaasittomat reagenssisäiliöt (kertakäyttöinen kaukalomalli, 50 ml) (tai vastaava) | Yleinen laboratoriotuottaja |
| 15 ml:n kartioputket | Yleinen laboratoriotuottaja |
| 50 ml:n kartioputket | Yleinen laboratoriotuottaja |
| Yhteensopivat aerosolinkestävät pipettikärjet | Yleinen laboratoriotuottaja |
| 96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levyt) | Fisher Scientific, osanumero AB-0859 tai vastaava |
| 96-kuoppaiset PCR-levyt, 0,2 ml (polypropeeni) | Yleinen laboratoriotuottaja |

Monistuksen jälkeiset välineet ja materiaalit

| Välineet | Toimittaja |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| NextSeq 550Dx -laite | illumina, luettelonumero 20005715 |
| Sentrifugi (levysentrifugi), jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • 96-kuoppaisten mikrolevyjen sentrifugointi • 280 × g | Yleinen laboratoriotuottaja |

| Välineet | Toimittaja |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| PCR-laite, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Lämmitetty kansi (100 °C) • Kattaa lämpötila-alueen 4 °C – 99 °C • ±0,25 °C:n lämpötilatarkkuus • Yhteensopiva 96-kuoppaisten PCR-levyjen kanssa, 0,2 ml • Katso PCR-laitteen nousunopeus sivulla 24 | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Vorteksointilaite | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Mikronäyteinkubaattori 96-kuoppaisten MIDI-levyjen insertilla | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Kuivalämpöblokki, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Lämpötila-alue 25 °C – 99 °C • ±5 °C:n lämpötilatarkkuus • Varmista, että mikrosentrifugiputket ovat lämpöblokin kanssa yhteensopivia | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Levyravistin, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • 2 mm:n rata • Mahdollisuus ravistaa nopeudella 1 200 rpm ja 1 800 rpm | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Mikrosentrifugi | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Tiivistyskiila tai -tela | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Magneettinen jalusta, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Suunniteltu paramagneettisten helmien saostamiseen/erotukseen • Magneetit jalustan sivuilla, ei pohjassa • 96-kuoppaisille MIDI-levyille | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Tarkkuuspipetit, joiden tekniset ominaisuudet ovat seuraavat: <ul style="list-style-type: none"> • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,02 ml • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 0,1 ml, 0,2 ml tai 0,5 ml • Yksi- tai monikanavapipetti, jonka mittaväli on 1 µl tai 2 µl Pipetit on kalibroitava säännöllisesti ja niiden on oltava tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta. | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| Pipetointiväline | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| 10 ml:n serologisia pipettejä | Yleinen laboratoriotoimittaja |
| 96-kuoppalevyjen liimapintaiset sulkukannet, joilla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> • Irrotettava • Sopiva "skirted"- tai "semiskirted"-tyypin PCR-levyille • Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilanvaihteluja -20°C – 100°C • DNAasiton/RNAasiton | Yleinen laboratoriotoimittaja |

| Välineet | Toimittaja |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 2 ml:n mikrosentrifugiputket, nukleaasittomat | Yleinen laboratoritoimittaja |
| Mikrosentrifugin putket, nukleaasittomat | Yleinen laboratoritoimittaja |
| Nukleaasittomat reagenssisäiliöt (kertakäyttöinen kaukalomalli, 50 ml) (tai vastaava) | Yleinen laboratoritoimittaja |
| 15 ml:n kartioputket | Yleinen laboratoritoimittaja |
| 50 ml:n kartioputket | Yleinen laboratoritoimittaja |
| Yhteensopivat aerosolinkestävät pipettikärjet | Yleinen laboratoritoimittaja |
| 96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levyt) | Fisher Scientific, osanumero AB-0859 tai vastaava |
| 96-kuoppaiset PCR -levyt, yhteensopivia PCR-laitteen kanssa, 0,2 ml (polypropeenikuopat) | Yleinen laboratoritoimittaja |
| Jää- tai kylmäblokki | Yleinen laboratoritoimittaja |

Ultrasonikaattorin määrykset DNA-fragmentointia varten

DNA:n fragmentointi eli shearing vaikuttaa määryksen suorituskykyyn määrittämällä fragmentin koon jakauman, mikä puolestaan vaikuttaa sekvensoinnin kattavuuteen. Useita fokusoidun ultrasonikaation asetuksia arvioitiin ja optimoitiin TSO Comprehensive (EU) -määrykselle ([Taulukko 5](#)).

- Fragmentointiaika säädettiin maksimoimaan MEDIAN_EXON_COVERAGE-mittari, josta on annettu yhteenveto kohdassa [Laadunvalvonta sivulla 79](#). Fragmentointiajat (kts. [Taulukko 5](#)) ja MEDIAN_INSERT_SIZE-tulokset olivat erilaisia eri määryksissä.
- Kokoonpanot 1–4 testattiin 8-sarjan lasiputkilla, kun taas määryksessä 5 käytettiin yhtä lasiputkea. Putken tilavuuskapasiteetit on esitetty kohdassa [Taulukko 5](#).
- Kokoonpanojen 3, 4 ja 5 (pienemmät vesihaudetilavuudet) optimoinnissa käytettiin pulsointia ja ne fragmentoitiin pienemmän tilavuuden putkiin. Putken tilavuuskapasiteetit vaikuttavat fragmentointiparametreihin.
- Kokoonpano 4 (linja-anturi, keskikokoinen vesihaudetilavuus, vesi jonka kaasu on poistettu) tarvitsi pitkän pulssiviiveen (40 sekuntia), jotta saavutettiin samanlainen MEDIAN_EXON_COVERAGE kuin kokoonpanoilla 1 ja 2 nimellisellä 40 ng:n syötteellä.
- Kokoonpanon 3 optimaaliset asetukset johtivat hieman suurempaan fragmenttikoon jakautumiseen muihin kokoonpanoihin verrattuna (MEDIAN_INSERT_SIZE oli noin 5–10 emäsparia suurempi).
- Kokoonpanoissa 3 ja 5 käytettiin vettä, josta ei ole poistettu kaasua, ja pienimpiä vesihaudekokoja ja ne edellyttivät suurempaa DNA-syötettä (50 ng kokoonpanossa 3, 60 ng kokoonpanossa 5), jotta saavutettiin samanlainen MEDIAN_EXON_COVERAGE verrattuna muihin kolmeen kokoonpanoon, joissa käytettiin nimellistä 40 ng:n syötettä.

- Kokoonpanoissa 3 ja 5 on enemmän vaurioita ja/tai denaturointia ja näin ollen vähemmän käytettävissä olevien dsDNA-molekyylien todellista massaa kirjaston valmistelua varten.

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

Taulukko 5 Fokusoitun ultrasonikaattorin määritykset arvioituina

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

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

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

PCR-laitteen nousunopeus

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

Näytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen

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

Näytettä koskevat vaatimukset

FFPE-kudos

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

Geenin monistumisten ja RNA-varianttien kasvainsisältö riippuu monistumisen tai fuusion ilmentymisen laajuudesta (kts. kohta [Kasvainsisältö sivulla 101](#)).

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

Suuri määrä nekroottista kudosta ($\geq 25\%$) voi haitata TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kykyä havaita geenin monistumisia ja RNA-fuusioita. Jos näyteosiot sisältävät yli 25 % nekroosia kudoksen kokonaispinta-alalla, nekroottinen kudos tulee makrodissektoida. Jos laboratorio käyttää RNA:ta määrityksen kanssa, hemoglobiinia sisältävää kudosta on vältettävä tai se on minimoitava, kun leikkeitä otetaan kudusblokista. Kts. kohta [Häiritsevät aineet sivulla 93](#).

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

Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys

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

Kirjaston säilytys

Voit säilyttää kirjastoja alhaisen sitoutumisen PCR-levyillä 7–30 päivän ajan kirjastotyyppistä riippuen (katso [Taulukko 6](#)).

Taulukko 6 Kirjaston säilytysajat

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

Varoitukset ja varotoimet

Turvallisuus



VAROITUS

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

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

Laboratorio

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

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

Määrittäminen

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

6. Ellei turvallista pysähtymispistettä ole määritetty kohdassa [Käyttöohjeet sivulla 38](#), jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.
7. Säilytä määritysreagenssit tai -komponentit määritetyssä lämpötilassa merkityillä monistusta edeltävillä ja monistuksen jälkeisillä alueilla.
8. Älä säilytä reagensseja automaattisen sulatusjärjestelmän omaavassa säilytysyksikössä tai jääkaapin ovilokeroissa.
9. Älä pakasta helmiä sisältäviä reagensseja (LNB1, SPB ja SMB).
10. Älä käytä väärin säilytettyjä reagensseja.
11. Älä poikkea kullekin reagenssille määritellyistä sekoitus- ja käsittelyohjeista. Reagenssien riittämätön sekoittaminen tai liiallinen vorteksointi voi johtaa epäonnistuneisiin näytetuloksiin.
12. FSM:ssä, SSM:ssä, ERA1-B:ssä ja TCB1:ssä voi olla tuotteeseen liittyviä hiukkasia. Noudata kunkin reagenssin käsittelyohjeita. FSM:n ja SSM:n sekoitusvaiheiden jälkeen jäljelle jääneet valkoiset tuotteeseen liittyvät hiukkaset eivät vaikuta suorituskykyyn.
13. Valmista tuoreet master mix -seokset ja hävitä jäljellä oleva määrä käytön jälkeen.
14. Valmista aina tuore 80-prosenttinen etanoliliuos RNAasi/DNaasi-vapaalla vedellä pesuvaiheita varten. Etanoli voi absorboida vettä ilmasta, mikä voi vaikuttaa tuloksiin. Hävitä 80-prosenttinen etanoliliuos käytön jälkeen voimassa olevien määräysten mukaisesti.
15. Siirrä määritetty eluaattimäärä. Määritettyä pienemmän eluaattimäärän siirtäminen eluointivaiheiden aikana voi vaikuttaa tuloksiin.
16. Noudata seuraavia ultrasonikaattoreita koskevia ohjeita. Muista noudattaa valmistajan ohjeita.
 - Lisää gDNA ultrasonikaattorin putkeen hitaasti välttääksesi kuplien muodostumisen. Liialliset kuplat tai ilmarako fragmentointiputkessa voivat johtaa keskeneräiseksi jäävään fragmentoitumiseen.
 - Annostele ultrasonikaattorin putkiin hitaasti ja vältä roiskumista.
 - Älä työnnä pipettikärkeä ultrasonikaattorin putken pohjaan, kun poistat fragmentoitunutta DNA:ta, jotta nesteen siirtyminen ja näytteen häviäminen voidaan välttää.
17. Älä pipetoi alle 2 µl:n näytemäärää.
18. Älä käytä kaukaloa reagenssien lisäämiseen niitä vaiheita varten, joissa edellytetään alle 10 µl:n materiaalin lisäämistä jokaiseen näytesyvennykseen.
19. Käytä ohutkärkistä pipettiä siirtäessäsi fragmentoitunutta DNA-näytettä ultrasonikaattorin putkista kirjaston valmistelun (LP) levyille.
20. Älä yhdistä SUA1- ja UMI-adaptoreita toisiinsa.
21. Käytä SUA1-adaptoreita RNA-näytteiden kanssa.
22. Käytä UMI-adaptoreita DNA-näytteiden kanssa.
23. Määritä kullekin kirjaston näytteelle eri indeksialukkeet, jotta jokainen kirjasto voidaan tunnistaa yksilöivästi, kun se yhdistetään sekvensointia varten yhteen virtauskyvettiin.
24. Älä yhdistä CPxx- ja UPxx-indeksialukkeita samaan kirjastoon.

25. Näytteiden ja indeksialukkeiden yhteensopimattomuudet voivat saada aikaan virheellisen tulosraportoinnin johtuen positiivisen näytteen tunnistuksen menettämisestä. Lisää näytetunnukset ja määritä indeksit Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -analyysimoduulissa ennen kirjaston valmistelun aloittamista. Kirjaa näytetunnukset, indeksointi ja levyn kuoppasuunta viitteeksi kirjaston valmistelun yhteydessä.
26. Käytä RNA-näytteistä johdettuihin kirjastoihin vain UPxx-indeksejä.
27. Käytä DNA-näytteistä johdettuihin kirjastoihin UPxx- tai CPxx-indeksejä.
28. Sekvensoi enintään 8 RNA-kirjastoa ja 8 DNA-kirjastoa virtauskyvettä kohti. Sekvensoi vähintään kolme kirjastoa. Noudata ohjeita kohdasta [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 35](#).
29. Kohtien [Kohteiden 1 sieppaaminen sivulla 59](#) ja [Kohteiden 2 sieppaaminen sivulla 63](#), sidontavaiheen jälkeen siirry välittömästi pesuvaiheeseen helmipellettien kuivumisen estämiseksi.
30. Poista pesuvaiheiden yhteydessä kaikki 80-prosenttinen etanoli kuoppien pohjasta. Etanolijäämät saattavat vaikuttaa tuloksiin.
31. Jotta määrittely toimii parhaalla mahdollisella tavalla, noudata kohdassa [Käyttöohjeet sivulla 38](#) ilmoitettua pesukertojen määrää.
32. Suspendoi menettelyn [Kirjastojen normalisointi sivulla 69](#) aikana kirjaston helmipelletti uudelleen perusteellisesti, jotta virtauskyvetin klusteritiheys on yhtenäinen.
33. Kaikista tähän tuotteeseen liittyvistä vakavista vaaratilanteista on välittömästi ilmoitettava Illuminalle ja toimivaltaisille viranomaisille siinä valtiossa, missä käyttäjä ja potilas ovat.

Menetelmää koskevia huomautuksia

- TSO Comprehensive (EU) -työnkulku voidaan suorittaa seuraavan aikataulun mukaisesti:
 - Päivä 1: cDNA-synteesi RNA-näytteistä, DNA-fragmentointi gDNA-näytteistä, kirjaston valmistelu ja yön suoritettavan (ensimmäisen) hybridisaation aloittaminen.
 - Päivä 2: Kirjastojen rikastus, rikastettujen kirjastojen normalisointi sekä kirjastojen lataus NextSeq 550Dx -laitteeseen.

Mikäli TSO Comprehensive (EU) -työnkulkua ei voida suorittaa tämän aikataulun mukaan, useita turvallisia pysähdyspisteitä määritetään kautta protokollan. Ellei turvallista pysähtymispistettä ole määritetty protokollassa, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

- RNA- ja DNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot voidaan valmistella samanaikaisesti erillisissä kuopissa.
- Tilavuus on ylimitoitettu master mix -seoksen valmistelutaulukoissa sen varmistamiseksi, että tilavuus on riittävä käsiteltävien näytteiden määrää varten.
- Käytä molekyyliilaatuista vettä, jossa ei ole nukleaaseja.
- Huuhtelee reagenssin lisäämisen jälkeen kärki aspiroimalla ja annostelemalla kerran levyn asianmukaiseen kuoppaan, ellei toimenpiteessä ole muuta määritetty.
- Huoneenlämpötilan määritelmänä on 15–30 °C.
- Reagenssit, näytteet ja/tai kirjastot on pidettävä kylmässä käyttöohjeiden tietyissä vaiheissa. Tämän määritelmä on jää tai vastaava.

PCR-laitteen ohjelmat

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

Levyn peittäminen ja avaaminen

- Peitä aina levyt uudella levyn liimapintaisella sulkukannella. Älä käytä sulkukansia uudelleen.
- Peitä levy kiinnittämällä liimapintainen kansi tiukasti levyyn tiivistyskiilalla tai -telalla.
- Peitä aina 96 kuopan levy uudella levyn liimapintaisella sulkukannella ennen protokollan seuraavien vaiheiden suorittamista.
 - Levyn ravisteluvaiheet
 - Sentrifugointivaiheet
 - PCR-laittevaiheet
 - Hybridisaatiot

- Pitkäaikainen säilytys
- Varmista, että reunat ja kuopat on peitetty, jotta voidaan vähentää ristikontaminaation ja haihtumisen riskiä.
- Aseta levy tasaiselle pinnalle, ennen kuin poistat sulkukannen hitaasti.
- Jos sulkukannella tai levyn kuoppien sivuseinämillä havaitaan nestettä tai kondensoitumista, sentrifugoi ennen avaamista kiihtyvyydellä 280 x g 1 minuutin ajan.
- Käytä liimapintaisia levyn sulkukansia, jotka ovat tehokkaita -20 °C – 100 °C:n lämpötilassa ja sopivat ”skirted”- tai ”semiskirted”-tyypin PCR-levyille.

Välineet

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

Levyn tyyppi ja levyn siirrot

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

Sentrifugointi

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

Reagenssien käsittely

- Sulje kaikki reagenssiputket uudelleen välittömästi käytön jälkeen haihtumisen rajoittamiseksi ja kontaminaation ehkäisemiseksi.
- Palauta reagenssit määritettyyn säilytyslämpötilaan, kun niitä ei enää tarvita toimenpidettä varten.

- Suorita reagenssin valmistelutoimet, jotka edeltävät kutakin toimenpideosiota kohdassa [Käyttöohjeet sivulla 38](#).
- Varmista, että master mix- ja Elution Mix -seosta sekä 80-prosenttista etanolia valmistetaan tarvittava määrä käsittelemiäsi näytteitä varten.
- Master mix- ja liuostaulukoissa ilmoitetut tilavuudet ovat ylimitoitettuja. Tilavuuden ylimitoituslaskelmat tehdään seuraavasti.
 - **Taulukko 15**
 - FSM-tilavuus = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{näytteiden} + \text{kontrollien määrä}) \times (1,25)$.
 - RVT-tilavuus = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{näytteiden} + \text{kontrollien määrä}) \times (1,25)$.
 - **Taulukko 22**
 - ERA1-B-tilavuus = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,20)$.
 - ERA1-A-tilavuus = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,20)$.
 - **Taulukko 30**
 - EE2-tilavuus = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - HP3-tilavuus = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - **Taulukko 31**
 - EE2-tilavuus = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - HP3-tilavuus = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,364)$.
 - **Taulukko 37**
 - LNA1-tilavuus = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (2,0)$.
 - LNB1-tilavuus = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (2,0)$.
 - **Taulukko 38**
 - EE2-tilavuus = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,25)$.
 - HP3-tilavuus = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{kirjastojen määrä}) \times (1,25)$.

Adapterisarjat

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

Helmien käsittely

- TSO Comprehensive (EU) -määritykseen sisältyy kolmentyyppisiä helmiä (SPB, SMB ja LNB1). Varmista, että toimenpiteen aikana käytetään oikeaa helmityyppiä.

- Tee kunkin helmityypin osalta oikea määrä pesuja.
- Varmista ennen käyttöä, että helmet ovat huoneenlämpötilassa.
- Sekoita helmiä homogeenisuuden varmistamiseksi 1 minuutin ajan ennen käyttöä.
- Noudata seuraavia ohjeita, kun sekoitat helmiä pipetillä:
 - Käytä sekoittamaasi tilavuuteen sopivaa pipettiä ja kärkikokoa.
 - Säädä tilavuusasetusta noin 50–75 %:iin näytteen tilavuudesta.
 - Pipetoi hitaasti vapauttamatta mäntää.
 - Vältä roiskeita ja kuplien muodostumista.
 - Sijoita pipetti pelletin yläpuolelle ja annostele suoraan pellettiin helmien vapauttamiseksi kuopasta tai putkesta.
 - Varmista, että helmipelletti on kokonaan liuoksessa. Liuoksen pitäisi olla tummanruskeaa, ja sen koostumuksen pitäisi olla homogeenista.
 - Arvioi, onko helmipellettiä. Aspiroi varovasti kuopan koko helmiliuosta kärkeen ja katso kuoppien pohjaa.
- Jos helmet aspiroidaan pipetin kärkeen magneettisten erotusvaiheiden aikana, annostele helmet takaisin levyn kuoppaan magneettisella jalustalla. Odota, kunnes neste on kirkasta (noin 2 minuuttia), ennen kuin jatkat toimenpiteen seuraavaan vaiheeseen.
- Helmiä pestessä:
 - Käytä levyille suositeltua magneettista jalustaa.
 - Annostele nestettä suoraan helmipelletille, jotta kuoppien sivulla olevat helmet kastuvat.
 - Pidä levy magneettisella jalustalla, kunnes toimenpiteessä kehoitetaan poistamaan levy.
 - Älä ravistele levyä sen ollessa magneettisella jalustalla.
 - Älä häiritse helmipellettiä levyn ollessa magneettisella jalustalla.
- Kun helmiä pestään tai poistetaan supernatanttia, kallista pipetin kärkeä kuoppien pohjaan, jotta ei synny tyhjiötä ja jotta liuosta ei vedetä pipetin kärkien suodattimiin.

Kirjastojen määrä ja indeksien valinta

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

Noudata TSO Comprehensive (EU):n osalta kohdissa [Taulukko 7](#) ja [Taulukko 8](#) annettua ohjeistusta RNA- ja/tai DNA-kirjastojen määrän määrittämisessä sekvensoinnille yhdellä virtauskyvetillä. Jos sekvensoit RNA- tai DNA-kirjastoja erikseen, katso [Taulukko 7](#). Jos sekvensoit RNA- ja DNA-kirjastoja samassa virtauskyvetissä, katso [Taulukko 8](#).

Taulukko 7 RNA- tai DNA-kirjastojen sekvensointi

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

* NTC:t eivät vaikuta pleksisyyteen.

Taulukko 8 RNA- ja DNA-kirjastojen sekvensointi samassa virtauskyvetissä

| Kirjastotyyppi | Minimi | Maksimi* |
|----------------|--------|----------|
| RNA | 3 | 8 |
| DNA | 3 | 8 |

* NTC:t eivät vaikuta pleksisyyteen.

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

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

Varmista, että näytteiden kanssa käyttämäsi indeksialukkeet vastaavat indeksejä, jotka valitset Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module -analyysimoduulissa. *Yhteensopimattomuudet voivat saada aikaan virheellisen tuloksetuloksen johtuen positiivisen näytteen tunnistuksen menettämisestä.*

TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä on kahdentyyppisiä indeksejä.

- **UPxx-indeksit**—Käytä RNA- tai DNA-näytteistä johdettuihin kirjastoihin UPxx-indeksejä.
- **CPxx-indeksit** — Käytä DNA-näytteistä johdettuihin kirjastoihin CPxx-indeksejä. Älä käytä CPxx-indeksejä RNA:sta johdettuihin kirjastoihin tai mikäli sekvensoidaan yhteensä kolmea DNA-kirjastoa.

Kun sekvensoidaan vain kolmea kirjastoa, vaatimukset ovat seuraavat:

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

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

TruSight Oncology Controls

TSO Comprehensive (EU) edellyttää TruSight Oncology Controls -kontrolleja, jotka koostuvat TruSight Oncology DNA -kontrollista ja TruSight Oncology RNA -kontrollista positiivisina kontrolleina. Sisällytä TruSight Oncology DNA -kontrolli jokaiseen DNA-sekvensointiajonaan ja TruSight Oncology RNA -kontrolli jokaiseen RNA-sekvensointiajonaan tietyn kirjaston valmistelutapahtumassa (sisällytä kontrollit myös yhdistettyihin DNA- ja RNA-ajoihin). Yksilöllinen positiivinen kontrolli valmistetaan jokaiselle suunnitellulle sekvensoidulle ajolle.

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

- Valmistele kirjastot positiivisista kontrolleista ja templaattia sisältämättömistä kontrolleista samalla tavalla kuin näytteet.
- Käytä DNA NTC:lle TEB:tä.
- Käytä RNA NTC:lle DNAasitonta/RNAasitonta vettä.
- Positiiviset kontrollit sisältyvät maksimikirjastovaatimukseen.
- NTC:t eivät sisälly minimikirjastovaatimukseen.
- Käytä NTC:lle UP-indeksejä, kun olet sekvensoimassa 3 kirjastoa.
- Koska NTC sekvensoidaan toistuvasti, tälle kontrollille valittuja indeksejä ei voi toistaa kirjaston valmistelutapahtumassa.

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

Taulukko 9 Kirjaston valmistelutapahtuma kuusi potilasnäytettä sisältävälle yksittäiselle ajolle

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

Taulukko 10 Kirjaston valmistelutapahtuma 20 potilasnäytettä sisältävälle kolmelle ajolle

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

Käyttöohjeet

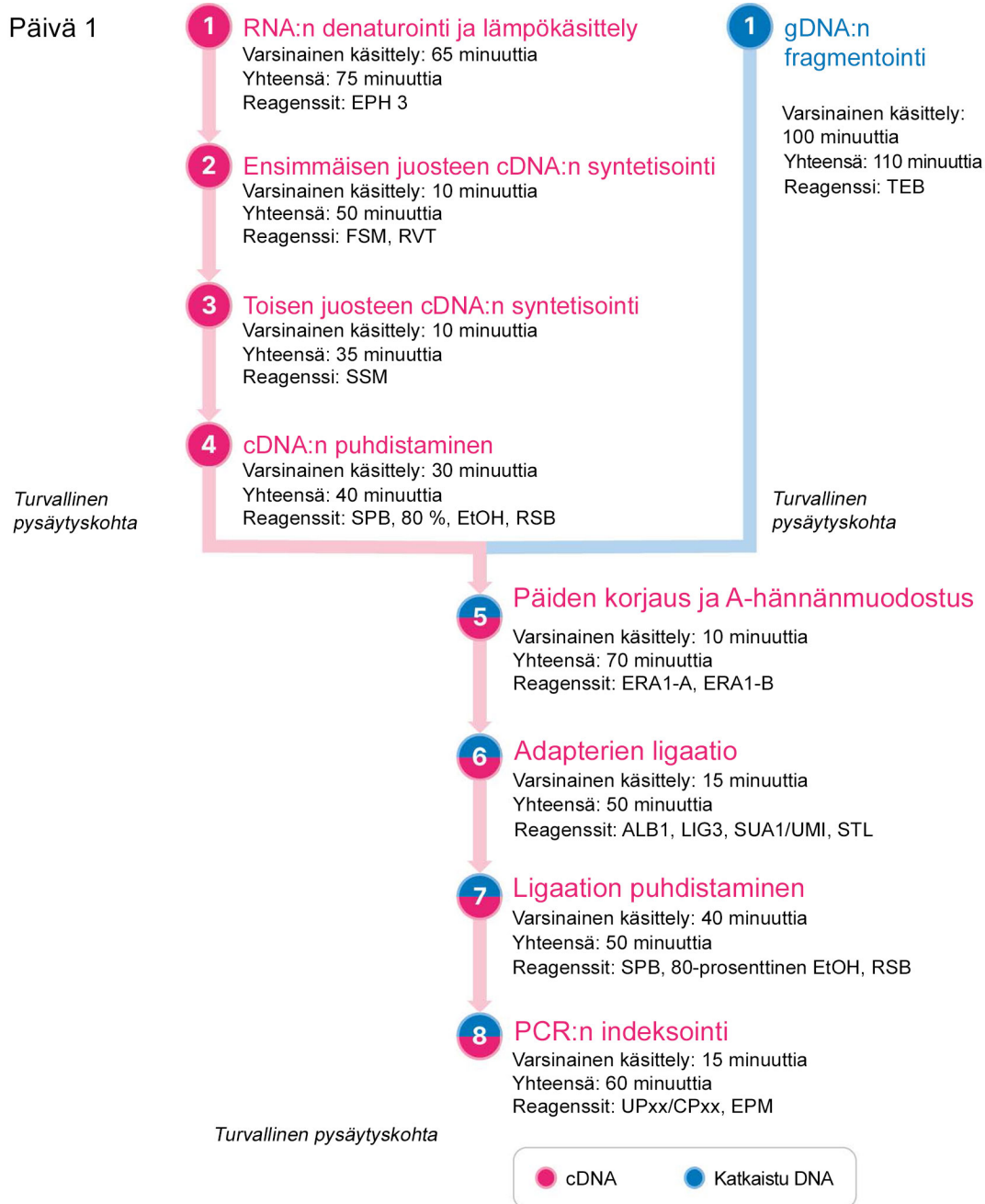
Yleiskatsaus TSO Comprehensive (EU) -työnkulusta esitetään kohdissa [Kuva 1](#) ja [Kuva 2](#).

Kirjaston valmistelun työnkulku

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

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

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

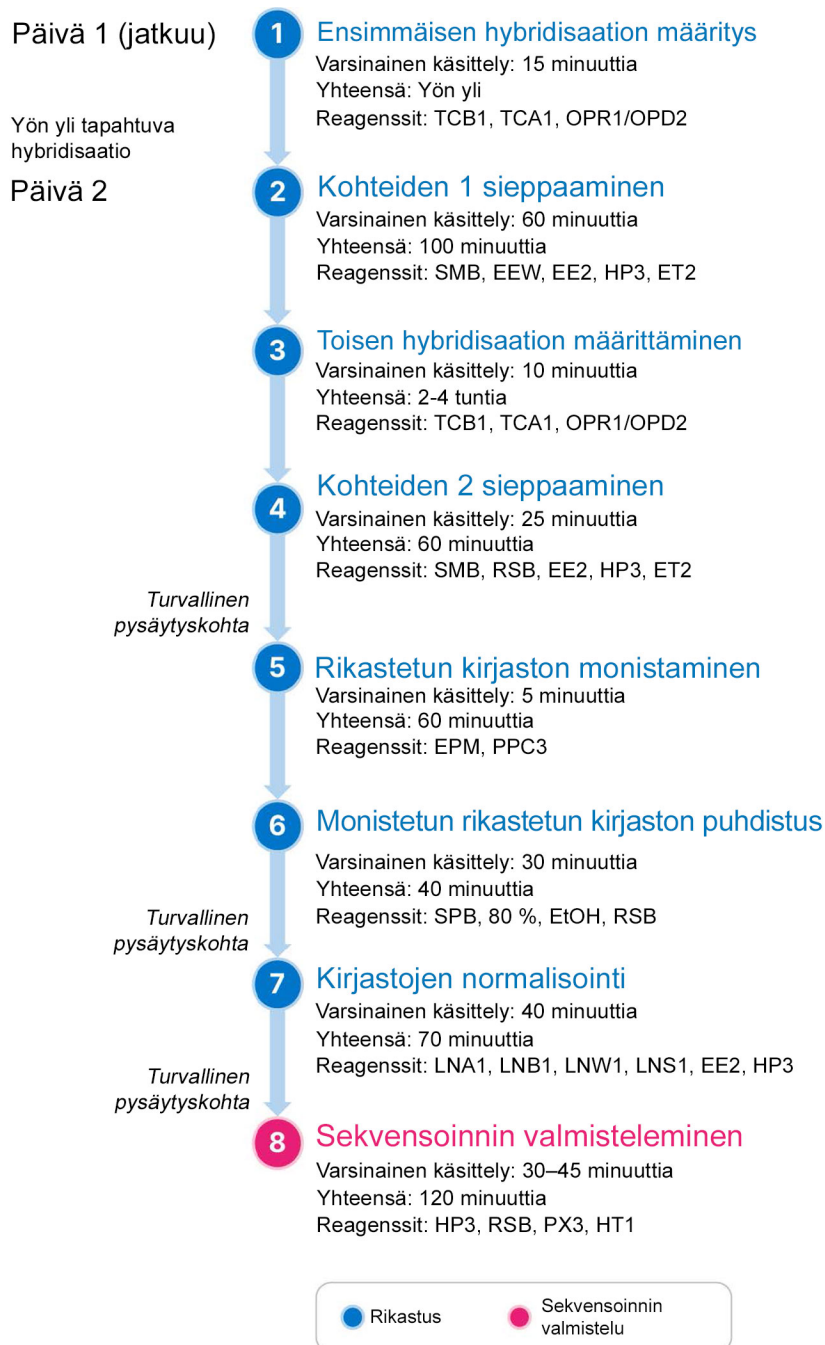


* Varsinaisen käsittelyn aika ja kokonaisaika ovat likimääräisiä.

Rikastuksen työnkulku

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

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



PCR-laitteiden ohjelmointi

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

Taulukko 11 Monistusta edeltävän PCR-laitteen ohjelmat

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

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

Taulukko 12 Monistuksen jälkeisen PCR-laitteen ohjelmat

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

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

Protokollavaiheiden valmisteleminen

1. Dekontaminoi työalueet perusteellisesti RNAasia/DNaasia estävällä puhdistusaineella.



HUOMIO

Kaikki työnkulun toimenpiteet edellyttävät RNAasitonta/DNaasitonta ympäristöä.

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

Taulukko 13 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (PN 20031127)

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

Taulukko 14 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

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

RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely

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

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.

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

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

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

Taulukko 15 FSM + RVT Master Mix

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

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

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

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

Toimenpide

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



HUOMIO

Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.

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

Ensimmäisen juosteen cDNA:n syntetisointi

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

Toimenpide

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

Toisen juosteen cDNA:n syntetisointi

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

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraava reagenssi.
 - SSM – sekoita kääntelemällä 10 kertaa. Sentrifugoi lyhyesti.

Toimenpide

1. Poista CF PCR -levy PCR-laitteesta.
2. Lisää 25 µl SSM:ää kuhunkin näytekuppaan.
3. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi CF PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
4. Ravista nopeudella 1 200 rpm 1 minuutin ajan.
5. Sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
6. Aseta PCR-laitteeseen ja aja 2ndSS-ohjelma.

Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).

7. Kun näytteet saavuttavat 4 °C:n lämpötilan, pitele yhden minuutin ajan ja siirry välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

cDNA:n puhdistaminen

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

Valmisteleminen

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

Taulukko 16 Valmista tuoretta 80-prosenttista EtOH:ta.

| Reagenssi | 4 kirjastoa | 8 kirjastoa | 16 kirjastoa | 24 kirjastoa |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| 100-prosenttinen EtOH, puhdas | 2 ml | 4 ml | 8 ml | 12 ml |
| RNAasiton/DNAasiton vesi | 500 µl | 1 ml | 2 ml | 3 ml |

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

Toimenpide

Sidonta

1. Poista CF PCR -levy PCR-laitteesta.
2. Suspendoi helmet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
3. Lisää välittömästi 90 µl SPB:tä kuhunkin BIND1 MIDI -levyn näytekuppaan.
Jos käytät kaukaloa SMB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohdainen materiaalmäärä kertoimella 1,05. Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SPB:tä on lisätty kuhunkin näytekuppaan.
4. Siirrä kunkin näytteen koko tilavuus (50 µl) CF PCR -levystä BIND1 MIDI -levyn vastaavaan kuppaan.
5. Hävitä tyhjä CF PCR -levy.
6. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BIND1 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.

7. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
8. Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
9. Aseta BIND1 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 5 minuutin ajaksi.
10. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekupasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

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

Eluointi

1. Irrota BIND1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
3. Lisää 22 µl RSB:tä kuhunkin näytekuppaan.
4. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BIND1 MIDI -levyyn. Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
5. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
6. Inkuboi huoneenlämmössä 2 minuuttia.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä PCF (puhdistetut cDNA-fragmentit). Jos pysäytät [TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA sivulla 48](#) mukaisessa kohdassa, käytä PCR-levyä.
9. Siirrä kustakin BIND1 MIDI -levyn näytekupasta 20 µl eluaattia PCF-levyn vastaavaan kuoppaan.
10. Hävitä tyhjä BIND1 MIDI -levy.
11. Lisää 30 µl RSB:tä kuhunkin PCF-levyn näytekuppaan.
12. Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
13. Aseta PCF-levyyn liimapintainen levyn sulkukansi ja säilytä se kylmässä.
14. Palauta EPH3, FSM, RVT ja SSM säilytykseen.
15. Jos käsittelet vain RNA:sta (cDNA) johdettuja näytteitä ja et pysähdy turvalliseen pysäytyskohtaan, jatka kohtaan [Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus sivulla 51](#).

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

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

Protokollavaiheiden valmisteleminen

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

Taulukko 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) (PN 20031119)

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

gDNA:n fragmentointi

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

Valmisteleminen

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

Toimenpide**Levyn valmisteleminen**

- Valmistele levy jollakin seuraavista vaihtoehdoista:
 - Vaihtoehto 1:** Käsittele gDNA-näytteet samanaikaisesti cDNA-näytteiden kanssa PCF MIDI -levyssä.
 - Merkitse PCF MIDI -levyyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).
 - Pidä kylmässä ja aseta sivuun kohdan [Fragmentoidun DNA:n siirtäminen sivulla 49](#) mukaista käyttöä varten.
 - Vaihtoehto 2:** Käsittele gDNA-näytteet samanaikaisesti cDNA-näytteiden kanssa, jos PCF PCR -levy on jäädytetty.
 - Sulata PCF PCR -levy huoneenlämpötilaan.
 - Sentrifugoi kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
 - Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
 - Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).
 - Siirrä kunkin näytteen kaikki 50 µl PCF PCR -levystä LP MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.

- f. Hävitä PCF PCR -levy.
- g. Aseta liimapintainen levyn sulkukansi ja pidä kylmässä kohtaan [Fragmentoidun DNA:n siirtäminen sivulla 49](#) asti.
- **Vaihtoehto 3:** Käsittele vain gDNA-näytteet.
 - a. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP (kirjaston valmisteleminen).
Jos pysäytät [TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA sivulla 50](#) mukaisessa kohdassa, käytä PCR-levyä.
 - b. Peitä ja aseta sivuun kohdan [Fragmentoidun DNA:n siirtäminen sivulla 49](#) mukaista käyttöä varten.

gDNA:n laimentaminen

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

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

Fragmentointi

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



HUOMIO

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

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

Fragmentoidun DNA:n siirtäminen

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

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

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

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

Protokollavaiheiden valmisteleminen

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

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

Taulukko 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (Freeze) Box (PN 20031118)

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

Taulukko 19 TruSight Oncology Comp Library Prep (Refrigerate) Box (PN 20031119)

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

Taulukko 20 TruSight Oncology Comp UP Index Primers Box (PN 20031120)

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

Taulukko 21 TruSight Oncology Comp CP Index Primers Box (PN 20031126)

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

Päiden korjaus ja A-hännänmuodostus

Tämä prosessi korjaa fragmentoinnista saatavat ulokkeet A-häntäulokkeellisiksi päiksi käyttämällä End Repair A-Tailing master mix (ERA1) -seosta.

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

Valmisteleminen

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

Taulukko 22 ERA1 Master Mix¹

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

¹ Taulukon määrät ovat hieman ylimitoitettuja. Katso laskennat kohdasta [Reagenssien käsittely sivulla 32](#).

- Sekoita pipetoimalla hitaasti 10 kertaa homogeenisuuden varmistamiseksi, ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyesti. Pidä ERA1 master mix -seos kylmässä.
- Valmistele levy valitsemalla jokin seuraavista vaihtoehdoista:
 - Vaihtoehto 1:** Jos näytteet ovat MIDI-levyssä, valmistele seuraavasti.
 - Merkitse MIDI-levyyn uudelleen merkinnällä LP2 (kirjaston valmisteleminen 2).

- Jos jotkin näytteet ovat erillisissä MIDI-levyissä, siirrä kaikki näytteet saman MIDI-levyn erillisiin kuoppiin levyasetteluun mukaan.
- **Vaihtoehto 2:** Jos levy on jäänytynyt, valmistele se seuraavasti.
 - a. Sulata PCF PCR -levy tai LP PCR -levy huoneenlämpötilaan.
 - b. Sentrifugoi levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
 - c. Sekoita pipetoimalla 10 kertaa.
 - d. Merkitse uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä LP2 (kirjaston valmisteleminen 2).
 - e. Siirrä kunkin näytteen kaikki 50 µl PCF PCR -levystä tai LP PCR -levystä LP2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
 - f. Hävitä PCF PCR- tai LP PCR -levy.

Toimenpide

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

Adapterien ligaatio

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

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

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

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - ALB1 — Sekoita vähintään 10 sekuntia vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - LIG3 — Sentrifugoi lyhyesti ja sekoita sitten pipetoimalla. Pidä kylmässä.
 - SUA1 — Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - UMI — Sekoita vorteksoimalla 10 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

- STL — Aseta sivuun toimeenpiteen aikana käyttöä varten.

Toimenpide

1. Poista LP2 MIDI -levy jäistä tai vastaavasta.
2. Lisää 60 µl ALB1:tä kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuoppaan. ALB1 on viskoosi liuos. Pipetoi hitaasti kuplien muodostumisen minimoimiseksi.
3. Lisää 5 µl LIG3:a kuhunkin näytekuoppaan.
4. Lisää adapterit seuraavasti.
Älä yhdistä erityyppisiä adaptereita toisiinsa.
 - **RNA-näytekuopat** — 10 µl SUA1:tä (sininen korkki) jokaiseen RNA:sta peräisin olevaan näytteeseen.
 - **DNA-näytekuopat** — 10 µl UMI:a (valkoinen korkki) jokaiseen DNA:sta peräisin olevaan näytteeseen.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Inkuboi huoneenlämmössä 30 minuuttia.
8. Sekoita STL vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
9. Lisää 5 µl STL:ää kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuoppaan.
10. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
11. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.

Ligaation puhdistaminen

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

Valmisteleminen

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

Taulukko 23 Valmista tuoretta 80-prosenttista etanolia.

| Reagenssi | 4 kirjastoa | 8 kirjastoa | 16 kirjastoa | 24 kirjastoa | 48 kirjastoa |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 100-prosenttinen EtOH, puhdas | 2 ml | 4 ml | 8 ml | 12 ml | 24 ml |

| Reagenssi | 4 kirjastoa | 8 kirjastoa | 16 kirjastoa | 24 kirjastoa | 48 kirjastoa |
|-----------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| RNAasiton/DNAasiton vesi | 500 µl | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 6 ml |

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

Toimenpide

Sidonta

- Suspendoi helmet uudelleen vorteksoimalla SPB:tä 1 minuutin ajan.
- Lisää välittömästi 112 µl SPB:tä kuhunkin LP2 MIDI -levyn näytekuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SMB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä kertoimella 1,05.
Hävitä kaikki jäljelle jäävä materiaali, kun SPB:tä on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi LP2 MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi huoneenlämmössä 5 minuuttia.
- Aseta LP2 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 10 minuutin ajaksi.
- Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

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

Eluointi

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

PCR:n indeksointi

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

Valmisteleminen

1. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EPM – Pidä kylmässä.
 - UPxx — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti. UPxx on indeksialuke, joka valitaan Local Run Manager -ohjelmiston Create Run -näytöllä ajon asetusten aikana.

- CPxx — Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi lyhyesti. CPxx on indeksialuke, joka valitaan Local Run Managerin ohjelmiston Create Run -näytöllä ajon asetusten aikana.
2. Varmista, että kunkin näytteen indeksit vastaavat ajoa, joka suunniteltiin TSO Comprehensive (EU) -analyysimoduulissa -ohjelmistossa ajon asetusten aikana. Huolehdi siitä, että noudatat indeksin valinnan ohjeita kohdasta [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 35](#).

**HUOMIO**

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

Toimenpide

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

**HUOMIO**

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

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

**HUOMIO**

Suorita kaikki seuraavat vaiheet monistuksen jälkeisellä alueella monistustuotteen siirtymisen estämiseksi.

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

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

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

Protokollavaiheiden valmisteleminen

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

Taulukko 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

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

Taulukko 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

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

Taulukko 26 TruSight Oncology Comp Content Set Box (PN 20031122)

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

Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen

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

Valmisteleminen

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

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

Toimenpide

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

Protokollavaiheiden valmisteleminen

1. Ota päivän 2 alussa reagenssiputki rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

| Reagenssi | Säilytys | Sulatusohjeet | Protokollavaihe |
|---------------------------------|-------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| SMB (tummansininen merkintä) | 2 °C – 8 °C | Anna lämmitä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan. | Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen |
| ET2 | 2 °C – 8 °C | Tuo huoneenlämpöön. | Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen |

| Reagenssi | Säilytys | Sulatusohjeet | Protokollavaihe |
|-----------|-------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| HP3 | 2 °C – 8 °C | Tuo huoneenlämpöön. | Kohteiden 1 sieppaaminen Kohteiden 2 sieppaaminen Kirjastojen normalisointi |
| TCB1 | 2 °C – 8 °C | Tuo huoneenlämpöön. | Toisen hybridisaation määrittäminen |
| RSB | 2 °C – 8 °C | Tuo huoneenlämpöön. | Kohteiden 2 sieppaaminen Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus |

Taulukko 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

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

Taulukko 29 Määritys Content Set Box (PN 20031122)

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

Kohteiden 1 sieppaaminen

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

Valmisteleminen

1. Esilämmitä MIDI-lämpöblokkisisäosilla varustettu mikronäyteinkubaattori 57 °C:n lämpötilaan.
2. Valmistele seuraavat reagenssit.
 - EEW – sekoita vorteksoimalla 1 minuutin ajan.

- EE2 – sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - HP3 – sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
 - SMB – varmista, että helmet ovat huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan.
Varmista, että tähän toimenpiteeseen käytetään **SMB:tä**, ei SPB:tä.
 - ET2 – aseta sivuun toimenpiteen aikana käyttöä varten.
3. Valmista uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos mikrosentrifugiputkeen.

Taulukko 30 EE2+HP3 Elution Mix kohteiden 1 sieppaamiseen

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

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

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

Toimenpide

Sidonta

- Poista HYB1 PCR -levy PCR-laitteesta.
- Sentrifugoi HYB1 PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
- Vorteksoi SMB:tä 1 minuutin ajan helmien uudelleensuspendoimiseksi.
- Lisää välittömästi 150 µl SMB:tä jokaiseen CAP1 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SMB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaalmäärä kertoimella 1,15, jotta materiaalia on riittävästi.
Hävitä jäljelle jäänyt materiaali sen jälkeen, kun SMB on lisätty kuhunkin näytekouppaan.
- Aseta pipetti 50 µl:aan ja siirrä kunkin kirjaston koko määrä HYB1 PCR -levyltä CAP1 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- Hävitä tyhjä HYB1 PCR -levy.
- Lisää CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
- Inkuboi esilämmitetyssä mikroinkubaattorissa 57 °C:n lämpötilassa 25 minuutin ajan.
- Aseta CAP1 MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
- Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekouppasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

**HUOMIO**

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

Pesu

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

Eluointi

1. Poista CAP1 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Vorteksoi uusi EE2+HP3 Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
3. Lisää varoen 17 µl EE2+HP3 Elution Mix -seosta kuhunkin CAP1 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
4. Hävitä jäljelle jäänyt EE2+HP3 Elution Mix.
5. Lisää CAP1 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi. Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
6. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
8. Merkitse uusi 96-kuoppainen PCR-levy merkinnällä ELU1 (Eluointi 1).

9. Sekoita ET2 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
10. Lisää 5 µl ET2:tä kuhunkin vastaavaan uuden ELU1 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
11. Siirrä varoen 15 µl eluaattia kustakin CAP1 MIDI -levyn kirjastokuopasta ELU1 PCR -levyn vastaavaan kuoppaan.
12. Hävitä tyhjä CAP1 MIDI -levy.
13. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU1 PCR -levvyyn.
14. Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
15. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
16. Palauta EEW säilöön.

Toisen hybridisaation määrittäminen

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

Valmisteleminen

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

Toimenpide

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

Älä yhdistä erilaisia koetintyyppisiä toisiinsa.

 - RNA-kirjastokuopat – 5 µl OPR1:tä (punainen korkki) kuhunkin RNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
 - DNA TSO Comprehensive (EU) -kirjastokuopat – 5 µl OPD2:ta (valkoinen korkki) kuhunkin DNA:sta peräisin olevaan kirjastoon.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU1 PCR -levvyyn.

Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.

6. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
7. Laita PCR-laitteeseen ja aja HYB2-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
8. Hybridisoi 57 °C:n lämpötilassa vähintään 1,5 ja enintään 4 tunnin ajan.
9. Palauta hybridisaatioreagenssit säilytykseen.

Kohteiden 2 sieppaaminen

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

Valmisteleminen

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

Taulukko 31 EE2+HP3 Elution Mix kohteiden 2 sieppaamiseen

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

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

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

Toimenpide

Sidonta

1. Poista ELU1 PCR -levy PCR-laitteesta.
2. Sentrifugoi ELU1 PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.
3. Vorteksoi SMB:tä 1 minuutin ajan helmien uudelleensuspendoimiseksi.
4. Lisää välittömästi 150 µl SMB:tä jokaiseen CAP2 MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
Jos käytät kaukaloa SMB:n jakamiseen, kerro tarvittava näytekohtainen materiaolimäärä kertoimella 1,15, jotta materiaalia on riittävästi.
Hävitä jäljelle jäänyt materiaali sen jälkeen, kun SMB on lisätty kuhunkin näytekuoppaan.
5. Aseta pipetti 50 µl:aan ja siirrä kunkin kirjaston koko määrä ELU1 PCR -levyltä CAP2 MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
6. Hävitä tyhjä ELU1 PCR -levy.
7. Lisää CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
8. Ravista nopeudella 1 800 rpm 2 minuutin ajan.
9. Inkuboi mikronäyteinkubaattorissa 57 °C:n lämpötilassa 25 minuutin ajan.
Mikäli jatkat kohtaan [Rikastetun kirjaston monistaminen sivulla 66](#), noudata Protokollavaiheiden valmisteleminen -osiossa annettuja reagenssien sulatusohjeita.
10. Aseta magneettiselle jalustalle 2 minuutiksi.
11. Pidä CAP2 MIDI -levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.



HUOMIO

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

Pesu

1. Poista CAP2 MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
2. Sekoita RSB kääntämällä tai vorteksoimalla.
3. Lisää kuhunkin kuoppaan 200 µl RSB:tä.
4. Lisää CAP2 MIDI -levyyn liimapintainen levyn sulkukansi.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
5. Ravista nopeudella 1 800 rpm 4 minuutin ajan.
6. Aseta levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.

- Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
- Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.

Eluointi

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

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät menettelyn, sentrifugoi ELU2 PCR -levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä lämpötilassa -25 – -15 °C enintään 7 päivän ajan. Palauta RSB säilytykseen.

Protokollavaiheiden valmisteleminen

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

Taulukko 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

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

Taulukko 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

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

Rikastetun kirjaston monistaminen

Rikastettujen kirjastojen monistamiseen käytetään tässä vaiheessa alukkeita.

Valmisteleminen

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

Toimenpide

1. Sekoita PPC3 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
2. Lisää 5 µl PPC3:a jokaiseen ELU2 PCR -levyn kirjastokuoppaan.
3. Sekoita EPM vorteksoimalla 5 sekunnin ajan ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
4. Lisää 20 µl EPM:ää jokaiseen kirjastokuoppaan.
5. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi ELU2 PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat täysin haihtumisen estämiseksi.
6. Ravista nopeudella 1 200 rpm 2 minuutin ajan.
7. Aseta PCR-laitteeseen ja aja EL-PCR-ohjelma.
Katso kohta [PCR-laitteiden ohjelmointi sivulla 41](#).
Jos jatkat kohdan [Kirjastojen normalisointi sivulla 69](#) mukaisesti, noudata Protokollavaiheiden valmisteleminen-kohdan sulatusta koskevia ohjeita.
8. Palauta PPC3 ja EPM säilytykseen.

Monistetun rikastetun kirjaston puhdistus

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

Valmisteleminen

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

Taulukko 34 Valmista tuoretta 80-prosenttista etanolia.

| Reagenssi | 4 kirjastoa | 8 kirjastoa | 16 kirjastoa | 24 kirjastoa | 48 kirjastoa |
|-------------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 100-prosenttinen EtOH, puhdas | 2 ml | 4 ml | 8 ml | 12 ml | 24 ml |
| RNAasiton/DNAasiton vesi | 500 µl | 1 ml | 2 ml | 3 ml | 6 ml |

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

Toimenpide

Sidonta

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

Pesu

1. Pese helmet seuraavasti.
 - a. Pidä BIND2 MIDI -levy magneettisella jalustalla ja lisää 200 µl tuoretta 80-prosenttista EtOH:ta kuhunkin kuoppaan.
 - b. Odota 30 sekuntia.
 - c. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekupasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet toisen kerran.
3. Poista ja hävitä ohutkärkisellä pipetillä EtOH-jäämät jokaisesta kuopasta.
4. Hävitä käyttämätön 80-prosenttinen EtOH.

Eluointi

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

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

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

Protokollavaiheiden valmisteleminen

1. Ota reagenssiputki rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

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

Taulukko 36 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

| Reagenssi | Säilytys | Sulatusohjeet | Protokollavaihe |
|-----------|-------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| LNB1 | 2 °C – 8 °C | Anna lämmitä huoneenlämpöön 30 minuutin ajan. | Kirjastojen normalisointi |
| HP3 | 2 °C – 8 °C | Tuo huoneenlämpöön. | Kirjastojen normalisointi Sekvensoinnin valmisteleminen |
| LNW1 | 2 °C – 8 °C | Tuo huoneenlämpöön. | Kirjastojen normalisointi |
| LNS1 | 2 °C – 8 °C | Tuo huoneenlämpöön. | Kirjastojen normalisointi |

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

Kirjastojen normalisointi

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

Valmisteleminen

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

4. Valmista välittömästi uusi LNA1+LNB1 Master Mix -seos kartioputkeen.



HUOMIO

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

Taulukko 37 LNA1+LNB1 Master Mix* -seos

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

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

5. Vorteksoi LNA1 + LNB1 Master Mix -seos. Aseta sivuun [Sidonta sivulla 70](#) -vaihetta varten.
6. Valmista uusi EE2 + HP3 Elution Mix -seos mikrosentrifugin putkessa.

Taulukko 38 EE2 + HP3 Elution Mix -seos kirjastojen normalisoimiseen*

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

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

7. Vorteksoi uusi Elution Mix -seos ja sentrifugoi sitten lyhyesti. Siirrä syrjään [Eluointi sivulla 71](#) -vaihetta varten.
8. Jos PL PCR -levyä on säilytetty, sulata huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sitten kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan. Sekoita pipetoimalla.
9. Tee uuteen 96-kuoppaiseen MIDI-levyyn merkintä BBN (helmipohjainen normalisointi).
10. Aseta magneetti esille.

Toimenpide

Sidonta

- Vorteksoi LNA1+LNB1 Master Mix -seos.
- Lisää välittömästi 45 µl LNA1+LNB1 Master Mix -seosta kuhunkin BBN MIDI -levyn kirjastokuoppaan.
- Hävitä jäljelle jäävä LNA1+LNB1 Master Mix -seos.
- Lisää kustakin PL PCR -levyn kirjastosta 20 µl BBN MIDI -levyn vastaavaan kuoppaan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BBN MIDI -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
- Ravista nopeudella 1 800 rpm 30 minuutin ajan.
- Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi PL PCR -levyyn ja palauta säilytykseen.
- Aseta BBN MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.

9. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.

Pesu

1. Pese helmet seuraavasti.
 - a. Irrota BBN MIDI -levy magneettisesta jalustasta.
 - b. Lisää 45 µl LNWI:tä jokaiseen kirjastokuoppaan.
 - c. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi BBN MIDI -levyyn.
 - d. Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
 - e. Ravista nopeudella 1 800 rpm 5 minuutin ajan.
 - f. Aseta BBN MIDI -levy magneettiselle jalustalle 2 minuutin ajaksi.
 - g. Pidä levy magneettisessa jalustassa. Helmipellettiin koskematta poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 200 µl:aan asetetulla pipetillä.
2. Pese helmet *toisen* kerran.
3. Poista ohutkärkisellä pipetillä supernatanttijäämät jokaisesta kuopasta.

Eluointi

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



HUOMIO

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

10. Hävitä tyhjä BBN MIDI -levy.
11. Sekoita LNS1 vorteksoimalla.
12. Lisää 30 µl LNS1:tä kuhunkin NL PCR -levyn kirjastokuoppaan.

13. Sekoita pipetoimalla viisi kertaa.
14. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi NL PCR -levyyn.
Sulje reunat ja kuopat kokonaan.
15. Palauta LNB1, LNA1, EE2, LNW1 ja LNS1 säilytykseen.

TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

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

Protokollavaiheiden valmisteleminen

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

1. Poista kirjaston laimennuspuskuri (HT1) -25 °C – -15 °C:n säilytyslämpötilasta. Sulata huoneenlämpöiseksi ja pidä kylmässä.
2. Noudata *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 100000009513)* -dokumentaation valmisteluohjeita muiden pakkauksen tarvikkeiden kohdalla.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 sykliä)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 sykliä)
3. Ota reagenssiputki rasiasta ja noudata sulatusohjeita.

Taulukko 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (Freeze) Box (PN 20031121)

| Reagenssi | Säilytys | Sulatusohjeet | Protokollavaihe |
|--------------------------------------|-----------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| PhiX Internal Control (PX3 tai PhiX) | -25 °C – -15 °C | Sulata huoneenlämpöön. Pidä kylmässä. | Sekvensoinnin valmisteleminen |

Taulukko 40 TruSight Oncology Comp Enrichment (Refrigerate) Box (PN 20031123)

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

Sekvensoinnin valmisteleminen

Valmisteleminen

1. Tarkista [Kirjastojen määrä ja indeksien valinta sivulla 35](#).
2. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä dHP3 (laimennettu HP3).
3. Merkitse mikrosentrifugiputkeen dPhiX (laimennettu PhiX).
4. Esilämmitä lämpöblokki 96 °C:n lämpötilaan mikrosentrifugiputkia varten.
5. Valmistele jääastia tai vastaava.

PhiX-kontrollin laimennus ja denaturointi

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

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

1. Mikäli NL PCR -levy oli säilytyksessä, sulata se huoneenlämpötilaan ja sentrifugoi sen jälkeen levyä kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan.

2. Käytä monikanavapipettiä, jonka arvoksi on asetettu 30 µl, ja sekoita varovasti NL PCR -levyn kirjastot pipetoimalla viisi kertaa.

Käytä uusia kärkiä kutakin kirjastoa varten.



HUOMIO

Sekoita kirjastot hyvin optimaalisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

3. Valitse yksi seuraavista vaihtoehtoista kirjastojen poolausta, denaturointia ja laimennusta varten.
 - **Vaihtoehto 1:** Sekvensoi RNA-näytteistä ja DNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot samanaikaisesti. Katso [Vaihtoehto 1: DNA- ja RNA-kirjastot yhdessä sivulla 74.](#)
 - **Vaihtoehto 2:** Sekvensoi vain DNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot. Katso [Vaihtoehto 2: Vain DNA-kirjastot sivulla 75.](#)
 - **Vaihtoehto 3:** Sekvensoi vain RNA-näytteistä peräisin olevat kirjastot. Katso [Vaihtoehto 3: Vain RNA-kirjastot sivulla 76.](#)

Vaihtoehto 1: DNA- ja RNA-kirjastot yhdessä

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

Valmista ensimmäinen laimennus

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (Laimennus 1).
2. Siirrä 20 µl PDL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
3. Lisää 5 µl PRL:ää DIL1:een.
4. Hävitä PDL- ja PRL-putket.
5. Lisää 475 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennussuhde 1:20).

6. Sekoita DIL1-putki vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Valmista toinen laimennus

1. Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (Laimennus 2).
2. Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
3. Hävitä DIL1-putki.
4. Lisää 1 660 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennussuhde 1:850).
5. Sekoita valmistettu 20 pM dPhiX vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Lisää 2,5 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
7. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
8. Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 -kasettiin (300 sykliä).
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.
9. Hävitä DIL2-putki.
10. Sentrifugoi NL PCR -levy kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä sitä sitten -25 °C – -15 °C:n lämpötilassa enintään 30 vuorokautta.
11. Siirry sekvensointiin.
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.

Vaihtoehto 2: Vain DNA-kirjastot

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

Valmista ensimmäinen laimennus

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (Laimennus 1).
2. Siirrä 10 µl PDL:ää tyhjään DIL1-putkeen.
3. Hävitä PDL-putki.

4. Lisää 190 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennussuhde 1:20).
5. Sekoita DIL1 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Valmista toinen laimennus

1. Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (Laimennus 2).
2. Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
3. Hävitä DIL1-putki.
4. Lisää 1 660 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennussuhde 1:850).
5. Vorteksoi valmistettu 20 pM dPhiX ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Lisää 2,5 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
7. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
8. Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 -kasettiin (300 sykliä).
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.
9. Hävitä DIL2-putki.
10. Sentrifugoi NL PCR -levy kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä sitä sitten -25 °C – -15 °C:n lämpötilassa enintään 30 vuorokautta.
11. Siirry sekvensointiin.
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.

Vaihtoehto 3: Vain RNA-kirjastot

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

Valmista ensimmäinen laimennus

1. Merkitse mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL1 (Laimennus 1).
2. Siirrä 10 µl PRL:ää tyhjään DIL1-putkeen.

3. Hävitä PRL-putki.
4. Lisää 190 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL1-putkeen (laimennussuhde 1:20).
5. Sekoita DIL1 vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

Valmista toinen laimennus

1. Merkitse 2,0 ml:n mikrosentrifugiputkeen merkintä DIL2 (Laimennus 2).
2. Siirrä 40 µl DIL1:tä tyhjään DIL2-putkeen.
3. Hävitä DIL1-putki.
4. Lisää 1 646 µl ennalta jäädytettyä HT1:tä DIL2-putkeen (laimennussuhde 1:843).
5. Vorteksoi valmistettu 20 pM dPhiX ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
6. Lisää 16,7 µl valmistettua 20 pM dPhiX:ää DIL2-putkeen.
7. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
8. Lisää 1 300 µl DIL2:ta sulatettuun NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 -kasettiin (300 sykliä).
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.
9. Hävitä DIL2-putki.
10. Sentrifugoi NL PCR -levy kiihtyvyydellä 280 × g 1 minuutin ajan ja säilytä sitä -25 °C – -15 °C:n lämpötilassa enintään 30 vuorokautta.
11. Siirry sekvensointiin.
Ks. lisätietoja asiakirjasta *NextSeq 550Dx -laitteen viiteopas (asiakirjanumero 1000000009513)*.

Tulosten tulkinta

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

Ajotasolla luodaan seuraavat tuotostiedostot:

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

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

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

Kytkösdiagnostiikan tulokset

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

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

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

Kasvaimen profilointivariantit

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

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

Laadunvalvontaviat johtavat nollatuloksiin sellaisten varianttityyppien osalta, jotka ovat merkityksellisiä kyseiselle laadunvalvontamittarin hylkäykselle. Katso lisätietoja taulukoista [Taulukko 41](#) ja [Taulukko 42](#). Ne kasvaimen profilointisijainnit, joilla on riittämätön syvyys, luetellaan Low Depth Report -raportissa eikä TSO Comprehensive (EU) -raportissa.

Laadunvalvonta

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

Taulukko 41 TSO Comprehensive (EU) -raportin tuloksen laadunvalvontamittarit

| Tuotostyyppi | Mittari | Tekniset tiedot | Kuvaus | Ohjeavon hylkäyksen vaikutus* |
|-----------------|-------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Sekvensointiajo | PCT_PF_READIT (%) | ≥ 80,0 | Suodattimen (PF) läpäisevien readien prosenttiosuus. | Sekvensointiajo mitätöity. Ajon näytteiden kohdalla ei raportoitu tuloksia. |
| | PCT_Q30_R1 (%) | ≥ 80,0 | Emäksen tunnistusten keskimääräinen prosenttiosuus laatupisteytyksen ollessa vähintään Q30 readin 1 kohdalla. | |
| | PCT_Q30_R2 (%) | ≥ 80,0 | Emäksen tunnistusten keskimääräinen prosenttiosuus laatupisteytyksen ollessa vähintään Q30 readin 2 kohdalla. | |

| Tuotostyyppi | Mittari | Tekniset tiedot | Kuvaus | Ohjearvon hylkäyksen vaikutus* |
|---------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| DNA-kirjastot | CONTAMINATION_SCORE | <p>≤ 3 106 TAI > 3 106 ja P_ VALUE ≤ 0,049</p> | <p>Mittaustieto, jolla arvioidaan kontaminaation todennäköisyyttä yleisten varianttien VAF:n avulla. Kontaminaatiopisteytys perustuu SNP-kohteiden VAF-jakaumaan. Pitkälle uudelleenjärjestäytyneiden genomien arviointiin käytetty kontaminaation P-arvo, jota voidaan soveltaa vain, kun kontaminaatiopisteet ylittävät ohjearvon ylärajan.</p> | DNA-tuloksia ei raportoida. |

| Tuotostyyppi | Mittari | Tekniset tiedot | Kuvaus | Ohjeavon hylkäyksen vaikutus* |
|--------------|-------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| | MEDIAN_INSERT_SIZE (bp) | ≥ 70 | Näytteen mediaanifragmenttipituus. | TMB- tai pienten DNA-varianttien tuloksia ei raportoida. |
| | MEDIAN_EXON_COVERAGE (määrä) | ≥ 150 | Eksonifragmentin mediaanikattavuus kaikissa eksonin emäksissä. | |
| | PCT_EXON_50X (%) | ≥ 90,0 | Sellaisten eksoniemästen prosenttiosuus, joiden fragmenttikattavuus on 50-kertainen. | |
| | USABLE_MSI_SITES (määrä) | ≥ 40 | Sellaisten MSI-kohtien määrä, joita voidaan käyttää MSI-tunnistukseen (mikrosatelliittikohtien määrä riittäväillä sisältyvillä readeilla, jotta mikrosatelliitti-instabiilius voidaan tunnistaa). | MSI-tuloksia ei raportoida. |
| | COVERAGE_MAD (määrä) | ≤ 0,210 | Absoluuttisten poikkeamien mediaani kunkin CNV-kohdealueen normalisoidun lukumäärän mediaanista. | Geenin monistumisen tuloksia ei raportoida. |
| | MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (määrä) | ≥ 1,0 | Säilöjen raakamäärän mediaani CNV-kohdetta kohti. | |

| Tuotostyyppi | Mittari | Tekniset tiedot | Kuvaus | Ohjeavon hylkäyksen vaikutus* |
|---------------|-------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| RNA-kirjastot | MEDIAN_INSERT_SIZE (bp) | ≥ 80,0 | Näytteen mediaanifragmenttipituus. | Fuusioiden tai silmukointivariantin tuloksia ei raportoida. |
| | MEDIAN_CV_GENE_500X (kerroin) | ≤ 0,93 | MEDIAN_CV_GENE_500X on kattavuuden yhdenmukaisuuden mittari. Jokaiselle geenille, jonka kattavuus on vähintään 500x, lasketaan geenirungon kattavuuden variaatiokerroin. Tämä mittaustieto on näiden arvojen mediaani. Jos arvo on suuri, se tarkoittaa suurta variaatiota ja ongelmaa kirjaston valmistelussa, kuten vähäistä näytesyötettä ja/tai koettimen affiniteettipuhdistuksen ongelmia. Tämä mittaustieto lasketaan käyttämällä kaikkia readeja (mukaan lukien duplikaateiksi merkityt readit). | |
| | TOTAL_ON_TARGET_READS (määrä) | ≥ 9 000 000 | Sellaisten readien kokonaismäärä, jotka kartoitetaan kohdealueille. Tämä mittaustieto lasketaan käyttämällä kaikkia readeja (mukaan lukien duplikaateiksi merkityt readit). | |

* Onnistuneiden tulosten kohdalla on merkintä PASS (HYVÄKSYTTY).

Taulukko 42 TSO Comprehensive (EU) -raportin tuloksen kontrollimitarit

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

* Onnistuneiden tulosten kohdalla on merkintä PASS (HYVÄKSYTTY).

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

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

Vianmääritys

Seuraavan taulukon avulla voit tehdä työnkulun ongelmien vianmäärityksen. Jos näytteen sekvensointiajo tai kirjaston valmistelu epäonnistuu kaksi kertaa, vianmäärityksen lisätoimet saattavat olla tarpeen. Ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.

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

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

| Havainto | Mahdollinen syy | Suosittelut toimenpiteet |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE -kriteerit eivät täyty. | Katso kohdasta Varoitukset ja varotoimet tietoja ristikontaminaation välttämiseksi. Tarkista levyn asettelu ja kirjaston indeksointi varmistaaksesi, että saman indeksin kirjastoja ei ole sekvensoitu yhdessä. Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta asiaan liittyvien kirjastojen osalta. Katso kohta gDNA:n fragmentointi sivulla 48 . Kontaminaatio on voinut tapahtua näytteen uuttamisen aikana. Uuttaminen on ehkä toistettava sen varmistamiseksi, että näytteessä ei ole kontaminaatiota. |
| DNA-kirjasto ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita (jatkuu). | Käytettävä MSI epäonnistui. | Tarkista ultrasonikaattorin valmistajalta asetukset käyttöä varten (mukaan lukien vedenpinta ja putkityyppi). Varmista, että näytteet lisätään määrittämiseen asianmukaisesti. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25 ja Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifointi ja säilytys sivulla 26 . Näytteen uusi uuttaminen ja/tai vaiheen gDNA:n fragmentointi toistaminen voi olla tarpeen, jos näyte on liian fragmentoitunut tai vaurioitunut. |
| | Näyte voi olla liian fragmentoitunut tai siinä voi olla nukleiinihappovaurioita, jotka vaikuttavat kykyyn luoda riittävän yksilöityjä kirjastoja. | Tarkista kohta Ultrasonikaattorin määrittämiset DNA-fragmentointia varten sivulla 23 ja ultrasonikaattorin valmistajan käyttöasetukset (mukaan lukien veden pitoisuus ja putkityyppi). Varmista, että näytteet lisätään määrittämiseen asianmukaisesti. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25 , ja Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifointi ja säilytys sivulla 26 . Näytteen uusi uuttaminen ja/tai vaiheen gDNA:n fragmentointi toistaminen voi olla tarpeen, jos näyte on liian fragmentoitunut tai vaurioitunut. |

| Havainto | Mahdollinen syy | Suosittelut toimenpiteet |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| RNA-kirjasto ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita. | Näytesyötettä koskevia vaatimuksia ei noudatettu. | Varmista asianmukainen näytteen syöttö ja toista kirjaston valmistelu RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely -vaiheesta. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25 , ja Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26 . |
| RNA-kirjasto ei läpäise laadunvarmistuksen spesifikaatioita. | Käyttö- tai laitevirhe määrittämisen työkulussa. | Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäily käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys. <ul style="list-style-type: none"> Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 73. Rikasta kirjastot uudelleen monistettujen kirjastojen näytteiden (ALS) PCR-levyltä. Katso kohta Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen sivulla 57. Aloita kirjaston valmistelu työkulun alusta. Katso kohta RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely sivulla 43. |
| | Näyte voi olla liian fragmentoitunut tai siinä voi olla nukleiinihappovaurioita, jotka vaikuttavat kykyyn luoda riittävän yksilöityjä kirjastoja. | Varmista, että näytteet lisätään asianmukaisesti. Katso Näytettä koskevat vaatimukset sivulla 25 ja Nukleiinihapon uuttaminen, kvantifiointi ja säilytys sivulla 26 . Näytteen uusi uuttaminen voi olla tarpeen, jos näyte on liian fragmentoitunut tai vaurioitunut. |

| Havainto | Mahdollinen syy | Suosittelut toimenpiteet |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Positiivisen kontrollin epäonnistuminen (DNA/RNA). | Näytteen syöttöä koskevat vaatimukset eivät täytyneet positiivisen kontrollin osalta. | Varmista, että lisäys määrittämiseen tapahtuu asianmukaisesti. Tarkista levyn asettelu ja varmista, että asianmukaiset reagenssit (koettimet, indeksit) ovat asianmukaisissa kuopissa. Varmista, että positiivinen kontrollinäyte säilytetään etiketin ohjeiden mukaisesti. Toista kirjaston valmistelu jostakin seuraavista vaiheista riippuen siitä, missä epäily käyttövirhe tai laitevirhe tapahtui, kaikkien samaa positiivista kontrollia käyttävien näytteiden kohdalla. Jos tuntematon virhe tai muita virheitä tapahtui, ota yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen, jotta voidaan tehdä ajon vianmääritys. |
| | Käyttö- tai laitevirhe määrittämisen työnkulussa. | <ul style="list-style-type: none"> • Sekvensoi kirjastot uudelleen normalisoitujen kirjastojen (NL) PCR-levyltä. Katso kohta Sekvensoinnin valmisteleminen sivulla 73. • Rikasta kirjastot uudelleen monistettujen kirjastojen näytteiden (ALS) PCR-levyltä. Katso kohta Ensimmäisen hybridisaation määrittäminen sivulla 57. • Aloita kirjaston valmistelu työnkulun alusta. Katso kohta RNA:n denaturointi ja lämpökäsittely sivulla 43 tai gDNA:n fragmentointi sivulla 48. |
| NTC-virhe (DNA/RNA). | Ristikontaminaatio tai työalueen saastuminen tapahtui. | Katso kohdasta Varoitukset ja varotoimet tietoja työalueiden dekontaminoinnista ja ristikontaminaation välttämisestä. Tarkista levyn asettelu ja kirjaston indeksointi varmistaaksesi, että saman indeksin kirjastoja ei ole sekvensoitu yhdessä. |
| | Kirjaston virheellinen indeksointi. | Toista kirjaston valmistelu työnkulun alusta alkaen kaikille kirjastoille, joilla on yhteinen templaattia sisältämätön kontrolli. |

| Havainto | Mahdollinen syy | Suosittelut toimenpite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ohjelmisto osoittaa, että positiiviset ja/tai negatiiviset kontrollit eivät sisällyneet sekvensointiajoon. | Syöpätyypin virheellinen määritys Local Run Manager -sovelluksen ajosuunnittelussa. | Suorita analyysi siten, että kontrollit on tunnistettu oikein, kuten Analysis Module -työnkulkumuissa on neuvottu (kts. kohta <i>Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) Analysis Module Workflow Guide (asiakirjanumero 200008661)</i>). |

Suorituskykyominaisuudet

TSO Comprehensive (EU) on kohdennettu NGS-paneeli, jossa on 517 geeniä. Pienet DNA-variantit – yksittäiset nukleotidivariantit (SNV:t), monen nukleotidin variantit (MNV:t), insertiot ja deleetiot – ovat kelpoisia raportointiin kaikkien 517 geenin suhteen. Geenien monistumiset ovat kelpoisia raportointiin MET- ja ERBB2-geeneistä. Fuusiot ovat kelpoisia raportointiin 23 geenistä. Liitosvariantit ovat kelpoisia raportointiin MET- ja EGFR-geeneistä. Jotta variantit voidaan raportoida, ne on havaittava ja niistä on oltava näyttöä TSO Comprehensive (EU) -määrityksen KB:ssä, ja niiden on oltava kelpoisia testatun kudostyyppin perusteella. Jotta NTRK-fuusiot voidaan raportoida, fuusioparin on oltava 5', ja NTRK-kinaasialueen on oltava eheä.

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

[Taulukko 43](#) sisältää eri tutkimuksissa laskettujen mittaustietojen määritelmiä.

Taulukko 43 Mittaustietojen määritelmät

| Termi | Määritelmä |
|--------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Positiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (PPA) | Positiivisista kokonaistunnistuksista oikein tunnistettujen positiivisten prosenttiosuus suhteessa ortogonaaliseen menetelmään. |
| Negatiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (NPA) | Negatiivisista kokonaistunnistuksista oikein tunnistettujen negatiivisten prosenttiosuus suhteessa ortogonaaliseen menetelmään. |
| Yhtäpitävyyden kokonaisprosenttimäärä (OPA) | Kokonaishavainnoista oikein tunnistettujen positiivisten ja negatiivisten prosenttiosuus suhteessa ortogonaaliseen menetelmään. |
| Positiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (PPC) | Positiivisista kokonaistunnistuksista oikein tunnistettujen positiivisten tunnistusten prosenttiosuus suhteessa kontrolliolosuhteeseen suorassa parivertailussa. |
| Negatiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (NPC) | Negatiivisista kokonaistunnistuksista oikein tunnistettujen negatiivisten tunnistusten prosenttiosuus suhteessa kontrolliolosuhteeseen suorassa parivertailussa. |
| Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (PPC) | Sellaisten havaintojen prosenttimäärä, jotka ovat positiivisia kohteen suhteen sellaisten havaintojen joukossa, joiden odotetaan olevan positiivisia kohteen suhteen. |

| Termi | Määritelmä |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (NPC) | Sellaisten havaintojen prosenttimäärä, jotka ovat negatiivisia kohteen suhteen sellaisten havaintojen joukossa, joiden odotetaan olevan negatiivisia kohteen suhteen. |

Ristikontaminaatio

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

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

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

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

Nukleinihapon uuttamispakkauksen arviointi

TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä arvioitiin kolme kaupallisesti saatavilla olevaa DNA- ja RNA-uuttamispakkausta. Näillä kolmella uuttamispakkauksella eristettiin sekä DNA:ta että RNA:ta samoista FFPE-kudosleikkeistä. Pakkaukset erosivat toisistaan parafiinin poistoaineen ja nukleinihapon sitomisvaiheiden osalta ([Taulukko 44](#)). Pakkaus 1 oli ensisijainen uuttamispakkaus, jota käytettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen suorituskäytön määrittämisessä.

Taulukko 44 Pakkauksen ominaisuudet

| Pakkaus | Parafiinin poistoaine | Nukleinihapon sidonta |
|---------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | Oma | Pylväs |
| 2 | Ksyleeni | Pylväs |
| 3 | Mineraaliöljy | Magneettihelmet |

Taulukko 45 ja Taulukko 46 sisältävät yhteenvedon uuttamispakkausten vaikutuksesta kirjaston kelvollisuuteen ja variantin tunnistamiseen. Erosta raportoitiin, jos uuttamispakkausten keskiarvot poikkesivat toisistaan huomattavasti. Keskimääräinen ero uuttamispakkausten välillä laskettiin käyttäen pakkausta 1 kontrollina, koska pakkausta 1 käytettiin useimpien TSO Comprehensive (EU) -määrityksen analyysitutkimuksissa käytettyjen nukleinihappojen eristämiseen. Keskimääräinen ero suhteessa pakkaukseen 1 raportoitiin sen havainnollistamiseksi, miten eri uuttamispakkaukset vaikuttaisivat muihin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen analyysitutkimuksiin.

Taulukko 45 Uuttamispakkaus vaikuttaa kirjaston validiteettiin

| Varianttityyppi | Kirjaston QC-mittari | Keskimääräinen ero suhteessa pakkaukseen 1 |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA:n pienet variantit/TMB | Eksonikattavuuden mediaani (määrä) PCT Exon50X (%) Inserttikoon mediaani (bp) | Pakkauksessa 2 56 readia vähemmän Pakkauksessa 3 0,298 % enemmän Pakkaus 2 ja pakkaus 3 3 bp:ta alempi |
| DNA MSI | Käytettävissä olevat MSI-paikat | Pakkauksessa 3 8 paikkaa enemmän |
| DNA:n geenien monistuminen | Coverage MAD (määrä) Säilöjen mediaanimäärä | Pakkauksessa 2 0,0043 vähemmän Pakkauksessa 2 0,5825 vähemmän, pakkauksessa 3 0,3086 vähemmän |
| RNA (Fuusiot/liitosvariantit) | Inserttikoon mediaani (bp) Loki (CV Gene500X:n mediaani) Kokonaismäärä kohdereadeissa | Pakkauksessa 3 2 bp:tä enemmän Pakkauksessa 2 0,029 enemmän Ei merkittävää eroa |

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

Taulukko 46 Uuttamispakkaus vaikuttaa varianttintunnistukseen

| Varianttityyppi (yksiköt) | Varianttintunnistus (keskimääräinen ero suhteessa pakkaukseen 1) |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pienet DNA-variantit (VAF) | Ei teknisesti merkittävä Kohdevariantit: pakkausten välinen varianssi oli pieni suhteessa jäämään Ei-kohdennetut variantit: Ei merkittäviä eroja kahdessa ensimmäisessä VAF-säilössä. Ei merkittäviä eroja, kun tilastollinen merkitsevyys havaitaan. |

| Varianttityyppi (yksiköt) | Variantt tunnistus (keskimääräinen ero suhteessa pakkaukseen 1) |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| TMB megaemäskohtainen mutaatio | Ei teknisesti merkittävä, pakkausten välinen varianssi oli pieni suhteessa jäämään |
| MSI (instabiilien kohtien prosenttiosuus) | Pakkauksessa 3 1,9 % vähemmän epästabiileissa kohdissa |
| Geenimonistus (kertamuutos) | Pakkauksessa 2 (0,06) ja pakkauksessa 3 (0,08) suurempi kertamuutos |
| Fuusiot (tukevat readit) | Pakkauksessa 2 tukevien readien määrä lisääntyi 51 % ja pakkauksessa 3 23 % |
| Liitosvariantit (tukevat readit) | Pakkauksessa 2 ja pakkauksessa 3 tukevien readien määrä lisääntyi 48 % |

Häiritsevät aineet

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

DNA-variantin tunnistus

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

RNA-variantin tunnistus

Tiedot eivät tue melaniinin (0,2 µg/ml), etanolin (5 %) ja ksyleenin (0,0001 %) aiheuttamaa häiriötä RNA-fuusioiden tai liitosvarianteissa. Hemoglobiini (2 mg/ml) häiritsi (vähensi tukevia readeja) kolmea eri liitosvarianttia MET-geenissä. Se ei vaikuttanut AR-geenin liitosvarianttiin (kolme eri näytettä) eikä yhteen

EGFR-geenin liitosvarianttiin (yksi näyte). Jos laboratorio käyttää RNA:ta määrittämisen kanssa, hemoglobiinia sisältävää kudosta on vältettävä tai se on minimoitava, kun leikkeitä otetaan kudosplokista.

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

Nekroosi

Nekroottisen kudoksen läsnäolo 70 %:iin asti ei vaikuttanut TMB-pisteisiin, MSI-tilaan, pieniin DNA-variantteihin tai RNA-liitosvarianttien tunnistamiseen. RNA-fuusiot (tukevat readit) ja geenien monistuminen (kertamuutos) - tunnistus vähenivät näytteissä, joiden kudosalueella oli $\geq 25\%$ (alueittain) nekroottista sisältöä. Jos näyteosiot sisältävät yli 25 % nekroosia kudoksen kokonaisalueella, nekroottinen kudos tulee makrodissektoida.

Stabiilius

Reaaliaikainen stabiilius

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

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

Käytönaikainen vakaussarja

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

Nukleiinihappojen stabiilius

Nukleiinihappojen (DNA ja RNA) stabiilius ja niihin liittyvä kvantitointi TruSight Oncology Comprehensive (EU) (TSO Comprehensive (EU)) -määrityksen kanssa käyttöä varten arvioitiin käyttämällä useiden kudostyyppien FFPE-näytteitä. FFPE-blokit jaettiin ja kaikki nukleiinihapot uutettiin kerralla. Uutettu nukleiinihappo sekoitettiin perusteellisesti, kvantifioitiin, tarkistettiin nukleiinihapon laadun osalta ja jaettiin kahteen sarjaan kertakäyttöisiä putkia, jotka jäädytettiin kahden aikapisteen ajaksi: T0-kontrolli (lähtötaso) ja T1-testi (≥ 28 päivää). Kaikki eristetty RNA säilytettiin $-85 - -65$ °C:ssa ja kaikki eristetty DNA säilytettiin $-25 - -15$ °C:ssa ilmoitetun ajanjakson ajan ja prosessoitiin sitten TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä useilla rinnakkaisnäytteillä ja useiden käyttäjien toimesta. T1-testitilaa verrattiin kontrolliin MSI-tilan, TMB-pisteiden, geenimonistusten, pienten DNA-varianttien, RNA-fuusioiden ja RNA-liitosvarianttien osalta. Tiedot osoittavat, että nukleiinihapot ja niiden kvantitointi TSO Comprehensive (EU) -määrityksen avulla käyttöä varten ovat stabiileja enintään 28 päivän ajan, kun niitä säilytetään suositelluissa lämpötiloissa (RNA -85 °C – -65 °C ja DNA -25 °C – -15 °C).

Kirjaston stabiilius

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen avulla valmistettujen kirjastojen stabiiliutta arvioitiin 8 FFPE-DNA- ja 8 FFPE-RNA-näytteiden avulla 9:stä eri kudostyyppistä otetulla näytteellä testattuna kolmena rinnakkaisnäytteenä koko määrityksen ajan. Normalisoidun kirjaston (NL) PCR-levyn kirjastot yhdistettiin ja sekvensoitiin päivänä 0. NL- ja PCR-levyn jäljellä olevat kirjastojen määrät säilytettiin jäädytettynä (-25 °C – -15 °C), minkä jälkeen ne yhdistettiin uudelleen ja sekvensoitiin päivänä 30. Mahdolliset tilastollisesti merkitsevät tulokset pienten DNA-varianttien osalta päivän 0 ja päivän 30 välillä olivat teknisesti merkityksettömiä. Päivän 0 ja päivän 30 tulosten välillä ei ollut tilastollisia eroja MSI-tilan, TMB-pisteytyksen, geenin monistumisten, RNA-fuusioiden ja RNA-silmukaointivarianttien kohdalla. Tiedot osoittavat, että TSO Comprehensive (EU) -määrityksestä luodut kirjastot ovat stabiileja enintään 30 päivää $-25 - -15$ °C:n lämpötilassa.

Objektilasille preparoidun FFPE-kudoksen stabiilius

TruSight Oncology Comprehensive (EU) (TSO Comprehensive (EU)) -määrityksessä käytettävän, objektilasille preparoidun FFPE-kudoksen stabiiliutta arvioitiin leikkaamalla FFPE-näyteblokit ($5 \mu\text{m}$:n leikkeet) erilaisista yksilöllisistä näytteistä, jotka on valmistettu preparaateiksi objektilaseille, minkä jälkeen niitä säilytetään huoneenlämpötilassa (22 °C) kahta aikapistettä varten. RNA uutettiin ja säilytettiin -65 °C – -85 °C:ssa ja DNA uutettiin ja säilytettiin $-15 - -25$ °C:ssa alle viikon ajan ennen testausta. Nukleiinihappomateriaali kvantifioitiin ja prosessoitiin sitten TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä 24 tunnin kuluessa kunkin aikapisteen osalta. Kussakin aikapisteessä useita rinnakkaisnäytteitä ja käyttäjiä näytettä kohti testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä ja verrattiin T0-aikapisteeseen MSI:n, TMB:n, geenimonistusten, pienten DNA-varianttien, RNA-fuusioiden ja RNA-liitosvarianttien, mukaan lukien CDX- ja kasvainprofilointivariantit, osalta. Varianttitunnistus arvioitiin ja täytti kaikki hyväksyntäkriteerit, mikä osoittaa, että TSO Comprehensive (EU) -määrityksen kanssa käytettävät objektilasille preparoidut FFPE-kudokset ovat stabiileja huoneenlämmössä enintään 4 viikon (28 päivän) ajan. On huomattu, että MSI-kirjaston QC:n validointiasteen 10 %:n lasku havaittiin 4 viikon (28 päivän) jälkeen käyttäjän ja säilytysajan yhdistelmästä johtuen. RNA:n fuusioita ja liitoksia tukevien readien määrä väheni noin 25 %:lla objektilaseilla 4 viikon (28 päivän) ajan säilytyksen jälkeen.

Nukleiinihapon syötteen titrauksen varmistusrajat

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

- MEDIAN_INSERT_SIZE ei reagoi yli 30 ng:n syötteeseen.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE osoitti positiivista korrelaatiota kasvavaan syötteeseen.
- PCT_EXON_50X kasvoi kasvaneen syötteen myötä aina 80 ng:aan asti.
- USABLE_MSI_SITES kasvoi kasvaneen syötteen myötä. Jotkin näytteet, joissa oli alle 40 USABLE_MSI_SITES 40 ng:ssä, saavuttivat ohjearvon korkeammilla syötteillä, mikä mahdollisti MSI-pisteiden laskennan.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET kasvoi syötteen kasvaessa.
- Kasvanut syöte kasvattaa COVERAGE_MAD:ia ylempää ohjearvorajaa kohti.

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

Tyhjän raja

Väärin negatiivisten prosenttimäärä (negatiivisten odotetusta kokonaismäärästä) arvioitiin käyttämällä rinnakkaisnäytetestausta normaalista tai hyvänlaatuisesta viereisestä FFPE-kudoksesta, jonka ei tule sisältää somaattisia variantteja pienten DNA-varianttien, geenin monistumisten, MSI:n, RNA-fuusioiden ja RNA-liitosvarianttien osalta. Vääriä positiivisia tuloksia ei analysoitu TMB:n osalta, koska kliinistä rajaa ei ole. Kuusi DNA- ja 6 RNA-FFPE-näytettä ajettiin duplikaattina 2 käyttäjällä 3 päivänä kunkin 2 reagenssierän kohdalla. Näytteiden alajoukko poolattiin uudelleen ja sekvensoitiin uudelleen 3 x vain DNA- ja 3 x vain RNA -formaattina väärin positiivisten arvioimiseksi useilla multipleksointiasetuksilla, joita tämä laite tukee. Lisäksi 30 lisä-RNA-näytettä ajettiin duplikaattina, ja ne prosessoitiin 1 reagenssierän kanssa, joka oli jaettu 2 käyttäjän kesken. Yhteensä oli 168 mahdollista havaintoa DNA:lle ja 228 RNA:lle, joista vähennettiin kelvottomat kirjastot kunkin varianttityypin osalta. Väärin positiivisten tulosten prosenttiosuus laskettiin geenitasolla monistumisille ja aseman tasolla (noin 1,9 miljoonaa asemaa) pienille DNA-varianteille. Virheellisten positiivisten tulosten prosenttiosuus DNA-varianttityypeille on esitetty [Taulukko 47](#). Väärin positiivisten prosenttimäärä RNA-fuusiolle ja liitosvarianteille oli 0 %, kuten [Taulukko 48](#) esittää.

Taulukko 47 Väärät positiiviset DNA-varianttityypeittäin

| Varianttityyppi | Väärät positiiviset |
|----------------------|----------------------------|
| Geenien monistumiset | 0 % (0/9912) |
| Pienet DNA-variantit | 0,0001 % (271/295 801 567) |

| Varianttityyppi | Väärät positiiviset |
|-----------------|---------------------|
| MSI | 0 % (0/156) |
| TMB | Ei sovellu* |

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

Taulukko 48 Väärät positiiviset RNA-varianttityypin mukaan

| Varianttityyppi | Väärät positiiviset |
|-----------------|---------------------|
| Fuusio | 0 % (0/226) |
| Liitosvariantti | 0 % (0/226) |

Havaitsemisraja

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

Tutkimus 1

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

DNA-varianttien kohdalla 2 erää analysoitiin itsenäisesti käyttämällä probittiregressiota tai osumamäärän lähestymistapaa (alhaisin testitaso osumamäärällä [piste-estimaatti] $\geq 95\%$) kunkin variantin eräkohtaisen LoD:n määrittämiseksi. Kahden reagenssierän suurempi LoD otettiin havaitsemisrajaksi kyseiselle variantille ([Taulukko 49](#)).

RNA-fuusioille käytettiin FFPE-solulinjoja kunkin fuusiogeenin LoD-arvojen arvioimiseksi. Tämän jälkeen LoD:it varmennettiin FFPE-kudoksilla käyttämällä duplikaatteja kirjastopreparaatteja 3 käyttäjällä, 3 laitteella ja 3 reagenssierällä, jotta saatiin 54 varianttikohtaista havaintoa lähellä LoD:ia, joka määritettiin FFPE-sukulinoilla. Kunkin fuusion väitetyt havaitsemisrajat ([Taulukko 50](#)) ovat vähäisimmät keskiarvoa tukevat readit, jotka saavuttivat osumamäärän (piste-estimaatti) $\geq 95\%$.

Taulukko 49 NTRK1:n, NTRK3:n ja RET:n pienten DNA-varianttien havaitsemisraja

| Markkeri | Krom. | Sijainti | Viite | Vaihtoehtoinen | Havaitsemisraja (variantin alleelitaajuus) |
|---------------------------------|-------|-----------|---------------|----------------|-----------------------------------------------|
| NTRK1 G595R (SNV)* | Chr1 | 156846342 | G | A | 0,038 |
| NTRK3 F617L (SNV)* | Chr15 | 88476283 | A | G | 0,032 |
| NTRK3 G623R (SNV)* | Chr15 | 88476265 | C | T | 0,036 |
| NTRK3 G696A (SNV)* | Chr15 | 88472468 | C | G | 0,027 |
| RET C618R (SNV) | Chr10 | 43609096 | T | C | 0,053 |
| RET M918T (SNV) | Chr10 | 43617416 | T | C | 0,045 |
| RET C634Y (MNV) | Chr10 | 43609949 | GC | AT | 0,045 |
| RET D898_E901del (deleetio)* | Chr10 | 43615611 | GAGATGTTTATGA | G | 0,055 |

Chr = kromosomi

* Nämä DNA-variantit analysoitiin probittiregression mukaan; muut DNA-variantit analysoitiin osumamäärän lähestymistavan mukaan.

Taulukko 50 NTRK- ja RET-fuusioiden määrityksen havaitsemisraja

| Geeni | Fuusio | Havaitsemisraja (tukevat readit) |
|-------|-------------|-------------------------------------|
| 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 |

Tutkimus 2

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

DNA-variantit

10 pienen DNA-variantin luokan LoD:t (yhteensä 25 varianttia) ja 2 DNA-geenin monistumiset (ERBB2 ja MET) määritettiin ja koottiin yhteen alueina (Taulukko 51). Mukana on myös RET-variantit tutkimuksen 1 havaitsemisrajasta. Kahden 3:sta insertiosta, jotka ovat yli 5 bp, LoD:t olivat 0,034 ja 0,036 VAF, ja kolmannen LoD oli 0,215 VAF. Jälkimmäinen oli insertio alhaisen kompleksisuuden alueella, jolla insertio lisää lisätoistoja, vaikuttaa kohdistukseen ja edellyttää lisäreadeja yhdenmukaista tunnistamista varten. Näin ollen jotkin alhaisen kompleksisuuden genomikontekstit saattavat vaikuttaa > 5 bp:n insertioiden tunnistamiseen.

Taulukko 51 Havaitsemisraja pienille DNA-varianteille ja geenin monistumisille

| Tyyppi (LoD:n mittayksikkö) | Varianttiluokka/genomikonteksti | Varianttien lukumäärä | Alue |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------|-------------|
| Pienet DNA-variantit (variantin alleelitaajuus) | SNV:t | 5 | 0,016–0,064 |
| | MNV:t | 3 | 0,022–0,048 |
| | Insertio (1–2 bp) homopolymeeritoistojen lähellä | 2 | 0,086–0,104 |
| | Insertio (1–2 bp) dinukleotiditoistojen lähellä | 2 | 0,038–0,051 |
| | Insertio (3–5 bp) | 2 | 0,030–0,056 |
| | Insertio (> 5 bp ja enintään 25 bp) | 3 | 0,034–0,215 |
| | Deleetio (1–2 bp) homopolymeeritoistojen lähellä | 2 | 0,094–0,100 |
| | Deleetio (1–2 bp) dinukleotiditoistojen lähellä | 2 | 0,033–0,070 |
| | Deleetio (3–5 bp) | 2 | 0,028–0,064 |
| | Deleetio (> 5 ja enintään 25 bp) | 2 | 0,047–0,055 |
| Geenimonistukset (kertamuutos) | Geenikohtaisesti (ERBB2, MET) | 2 | 2,034–2,195 |

Fuusiot

LoD:t määritettiin 18 fuusion osalta, mikä edusti 20 geeniä TSO Comprehensive (EU) -paneelissa, joka vaihteli 10–54,7 tukevan readin välillä ([Taulukko 52](#)). Lisäksi 3 geeniä (NTRK1-3) testattiin toisessa tutkimuksessa. RET-geeni testattiin tässä ja toisessa LoD-tutkimuksessa. Kuudentoista fuusion, joiden LoD:t oli määritetty, tiedot olivat yhteneväisiä yleisten 16 tukevan readin LoD:n kanssa, kun käytetään kaksipuolista 95 %:n ylempää luottamusväliä (UCL). Kahdella fuusiolla oli 24,7 ja 44,2 tukevan readin LoD:t, jotka eivät olleet yhtäpitäviä yleisen LoD:n kanssa.

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

Fuusiolla BCL2-IGHJ5, jonka LoD-arvo on 44,2 tukevaa readia, on hyvin lyhyt geeni (IGHJ5), ja sen katkoskohta on lähellä eksonin alkua, mikä edellyttää aukollisia lyhyitä kohdistuksia. Tämän seurauksena yhtäpitävä tunnistus edellyttää enemmän readeja.

Taulukko 52 Fuusioiden määrittelyn havaitsemisraja

| Fuusio | A-geenin katkoskohta | B-geenin katkoskohta | LoD | Yleinen LoD |
|-----------------|----------------------|----------------------|------|-------------|
| NCOA4-RET | 51582937 | 43612030 | 10,0 | kyllä |
| TMPRSS2-ERG | 39817543 | 42880007 | 13,2 | kyllä |
| KIF5B-RET | 32311775 | 43612032 | 14,5 | kyllä |
| ACPP-ETV1 | 132036419 | 14028762 | 17,2 | kyllä |
| FGFR3-TACC3 | 1801536 | 1736997 | 17,5 | kyllä |
| EML4-ALK | 29446394 | 42553391 | 20,2 | kyllä |
| FGFR1-GSR | 38274821 | 30569602 | 23,7 | kyllä |
| EGFR-GALNT13 | 55087056 | 155295102 | 24 | kyllä |
| ESR1-CCDC170 | 151857451 | 152023138 | 24,3 | kyllä |
| FGFR2-SRPK2 | 123353223 | 104926165 | 24,7 | ei |
| HNRNPUL1-AXL | 41743847 | 41782201 | 26,3 | kyllä |
| CD74-ROS1;GOPC | 149784243 | 117645578 | 28,2 | kyllä |
| SPIDR-NRG1 | 32453345 | 48353103 | 28,2 | kyllä |
| RAF1-VGLL4 | 12641189 | 11606492 | 28,5 | kyllä |
| DHX8;ETV4-STAT3 | 41613847 | 40474300 | 30,5 | kyllä |
| MKRN1-BRAF | 140487383 | 140158806 | 31,2 | kyllä |

| Fuusio | A-geenin katkoskohta | B-geenin katkoskohta | LoD | Yleinen LoD |
|------------|----------------------|----------------------|------|-------------|
| BCL2-IGHJ5 | 60793496 | 106330066 | 44,2 | ei |
| PAX3-FOXO1 | 41134997 | 223084859 | 54,7 | kyllä |

Liitosvariantit

Kahden RNA-liitosvariantin – MET ja EGFR – LoD:it olivat 18,7 ja 24,8 tukevaa readia.

Kasvainsisältö

Tutkimuksen tulokset antavat tietoa suosituksia varten kliinisten näytteiden kasvainsisällön osalta. Yleisesti ottaen: mitä suurempi kasvainsisältö, sitä korkeampi "signaali" (VAF, kertamuutos tai tukevat readit) kasvaimen varianteille. Minimikasvainsisällön suositukset perustuvat seuraaviin havaintoihin. LoD-arvot pienille DNA-variantteille ovat enintään 0,104 VAF (poikkeuksena TP53-insertio). Kasvaimen ajajamutaatioiden havaitsemiseksi (variantin alleelitaajuus 0,50) suositellaan 20 %:n kasvainsisältöä, jotta näiden mutaatioiden VAF:it olisivat 0,10 VAF ja jotta ne olisivat vähintään LoD:n tasolla. Kun kasvainsisältö on 20 %, geenit, jotka ovat monistuneet 5,5-kertaiseen muutokseen (11 kopiota), havaittaisiin yhtäpitävästi 1,8-kertaisen muutoksen havaitsemisrajan perusteella. Kun kasvainsisältö on 20 %, fuusiot, joissa on 80 tukevaa readia, tunnistettaisiin yhtäpitävästi 16 tukevan readin havaitsemisrajan perusteella.

Toistettavuus

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

Tutkimus 1

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

Kohteena olevien pienten DNA-varianttien ja RNA-fuusiovarianttien positiivisten tunnistusten prosenttimäärät (PPC) ja negatiivisten tunnistusten prosenttimäärät (PNC) korkealla tasolla määritettiin ensisijaisiksi päätetapahtumiksi. Kohteena olevien pienten DNA-varianttien ja RNA-fuusiovarianttien PPC:t ja PNC:t alhaisella

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

RET:n pienet DNA-variantit

Korkean tason pienen DNA-variantin paneeliosille kokonais-PPC oli 100,0 % (207/207; 95 %:n CI: 98,2 % – 100,0 %) (Taulukko 53).

Korkean tason pienen DNA-variantin paneeliosille kokonais-PNC oli 100,0 % (1 035/1 035; 95 %:n CI: 99,6 % – 100,0 %) (Taulukko 54).

Matalan tason kohdennettujen pienten DNA-variantin paneeliosien osalta kokonais-PPC matalan tason kohdennetuille pienen DNA-variantin paneeliosille oli 99,1 % (210/212; 95 %:n CI: 96,6 % – 99,7 %) ja kokonais-PNC oli 100,0 % (1 026/1 026; 95 %:n CI: 99,6 % – 100,0 %).

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

| Varianttitaso | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (Nukleotidi) | Kohdennettu variantti (Aminohappo) | n | VAF:n keskiarvo | Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI* |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----|-----------------|-----------------------------------------------|-------------------|
| Korkea | SNV | chr10_43617416_T_C | RET M918T | 34 | 0,156 | 100,0 % (34/34) | (89,8 %, 100,0 %) |
| Korkea | SNV | chr10_43609949_G_C | RET C634S | 36 | 0,140 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | SNV | chr10_43614996_G_A | RET V804M | 33 | 0,116 | 100,0 % (33/33) | (89,6 %, 100,0 %) |
| Korkea | MNV | chr10_43609949_GC_AT | RET C634Y | 35 | 0,195 | 100,0 % (35/35) | (90,1 %, 100,0 %) |
| Korkea | Deleetio | chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G | RET D898_E901del | 33 | 0,199 | 100,0 % (33/33) | (89,6 %, 100,0 %) |
| Korkea | Insertio | chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC | RET C634_T636dup | 36 | 0,095 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | Kaikki korkeat pienet DNA-variantit | Kaikki korkeat pienet DNA-variantit | Kaikki korkeat pienet DNA-variantit | 207 | Ei sovellu | 100,0 % (207/207) | (98,2 %, 100,0 %) |

| Varianttitaso | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (Nukleotidi) | Kohdennettu variantti (Aminohappo) | n | VAF:n keskiarvo | Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI* |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----|-----------------|-----------------------------------------------|-------------------|
| Matala | SNV | chr10_43617416_T_C | RET M918T | 35 | 0,042 | 100,0 % (35/35) | (90,1 %, 100,0 %) |
| Matala | SNV | chr10_43601830_G_A | RET V292M | 35 | 0,033 | 94,3 % (33/35) | (81,4 %, 98,4 %) |
| Matala | SNV | chr10_43613840_G_C | RET E768D | 36 | 0,044 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Matala | MNV | chr10_43609949_GC_AT | RET C634Y | 36 | 0,071 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Matala | Deleetio | chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G | RET D898_E901del | 34 | 0,065 | 100,0 % (34/34) | (89,8 %, 100,0 %) |
| Matala | Insertio | chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC | RET C634_T636dup | 36 | 0,037 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Matala | Kaikki matalat pienet DNA-variantit | Kaikki matalat pienet DNA-variantit | Kaikki matalat pienet DNA-variantit | 212 | Ei sovellu | 99,1 % (210/212) | (96,6 %, 99,7 %) |

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

* Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

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

| Varianttitaso | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (Nukleotidi) | Kohdennettu variantti (Aminohappo) | n ¹ | Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI ² |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| Korkea | SNV | chr10_43617416_T_C | RET M918T | 173 | 100,0 % (173/173) | (97,8 %, 100,0 %) |
| Korkea | SNV | chr10_43609949_G_C | RET C634S | 171 | 100,0 % (171/171) | (97,8 %, 100,0 %) |
| Korkea | SNV | chr10_43614996_G_A | RET V804M | 174 | 100,0 % (174/174) | (97,8 %, 100,0 %) |
| Korkea | MNV | chr10_43609949_GC_AT | RET C634Y | 172 | 100,0 % (172/172) | (97,8 %, 100,0 %) |
| Korkea | Deleetio | chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG | RET D898_E901del | 174 | 100,0 % (174/174) | (97,8 %, 100,0 %) |
| Korkea | Insertio | chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC | RET C634_T636dup | 171 | 100,0 % (171/171) | (97,8 %, 100,0 %) |
| Korkea | Kaikki korkeat pienet DNA-variantit | Kaikki korkeat pienet DNA-variantit | Kaikki korkeat pienet DNA-variantit | 1035 | 100,0 % (1 035/1 035) | (99,6 %, 100,0 %) |
| Matala | SNV | chr10_43617416_T_C | RET M918T | 177 | 100,0 % (177/177) | (97,9 %, 100,0 %) |
| Matala | SNV | chr10_43601830_G_A | RET V292M | 143 | 100,0 % (143/143) | (97,4 %, 100,0 %) |
| Matala | SNV | chr10_43613840_G_C | RET E768D | 176 | 100,0 % (176/176) | (97,9 %, 100,0 %) |

| Varianttitaso | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (Nukleotidi) | Kohdennettu variantti (Aminohappo) | n ¹ | Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI ² |
|---------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| Matala | MNV | chr10_43609949_GC_AT | RET C634Y | 176 | 100,0 % (176/176) | (97,9 %, 100,0 %) |
| Matala | Deleetio | chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G | RET D898_ E901del | 178 | 100,0 % (178/178) | (97,9 %, 100,0 %) |
| Matala | Insertio | chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC | RET C634_ T636dup | 176 | 100,0 % (176/176) | (97,9 %, 100,0 %) |
| Matala | Kaikki matalat pienet DNA-variantit | Kaikki matalat pienet DNA-variantit | Kaikki matalat pienet DNA-variantit | 1026 | 100,0 % (1 026/1 026) | (99,6 %, 100,0 %) |

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

² Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

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

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

| Varianttitaaso | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (Nukleotidi) | Kohdennettu variantti (Aminohappo) | n | VAF:n keskiarvo | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Rinnakkaisnäytteen SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|----------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|----|-----------------|-----------------------|---------------------|------------------|------------------------------|--------------------|
| Korkea | SNV | chr10_43617416_T_C | RET M918T | 34 | 0,156 | 0,011 (7,2 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,00 (0,0 %) | 0,017 (10,8 %) | 0,020 (13,0 %) |
| Korkea | SNV | chr10_43609949_G_C | RET C634S | 36 | 0,140 | 0,006 (4,6 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,00 (3,7 %) | 0,014 (10,2 %) | 0,017 (11,8 %) |
| Korkea | SNV | chr10_43614996_G_A | RET V804M | 33 | 0,116 | 0,005 (4,1 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,00 (1,7 %) | 0,012 (10,7 %) | 0,013 (11,6 %) |
| Korkea | MNV | chr10_43609949_GC_AT | RET C634Y | 35 | 0,195 | 0,000 (0,0 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,00 (4,4 %) | 0,012 (6,0 %) | 0,015 (7,5 %) |

| Varianttita so | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (Nukleotidi) | Kohdennettu variantti (Aminohappo) | n | VAF:n keskiarvo | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Rinnakkaisnäytteen SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|----------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|----|-----------------|-----------------------|---------------------|------------------|------------------------------|--------------------|
| Korkea | Deleetio | chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G | RET D898_E901del | 33 | 0,199 | 0,000 (0,0 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,011 (5,5 %) | 0,017 (8,6 %) | 0,020 (10,2 %) |
| Korkea | Insertio | chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC | RET C634_T636dup | 36 | 0,095 | 0,003 (3,0 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,00 (0,0 %) | 0,009 (9,6 %) | 0,010 (10,1 %) |
| Matala | SNV | chr10_43617416_T_C | RET M918T | 35 | 0,042 | 0,000 (0,0 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,00 (0,0 %) | 0,009 (22,2 %) | 0,009 (22,2 %) |
| Matala | SNV | chr10_43601830_G_A | RET V292M | 35 | 0,033 | 0,000 (0,0 %) | 0,003 (9,8 %) | 0,00 (6,2 %) | 0,007 (21,7 %) | 0,008 (24,6 %) |
| Matala | SNV | chr10_43613840_G_C | RET E768D | 36 | 0,044 | 0,003 (6,0 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,00 (0,0 %) | 0,008 (17,5 %) | 0,008 (18,5 %) |
| Matala | MNV | chr10_43609949_GC_AT | RET C634Y | 36 | 0,071 | 0,000 (0,0 %) | 0,008 (10,7 %) | 0,00 (0,0 %) | 0,011 (14,9 %) | 0,013 (18,4 %) |

| Varianttita so | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (Nukleotidi) | Kohdennettu variantti (Aminohappo) | n | VAF:n keskiarvo | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Rinnakkaisnäytteen SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|----------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|----|-----------------|-----------------------|---------------------|------------------|------------------------------|--------------------|
| Matala | Deleetio | chr10_43615611_ GAGATGTTTAT GA_G | RET D898_ E901del | 34 | 0,065 | 0,002 (2,5 %) | 0,006 (9,9 %) | 0,00 4 (6,4 %) | 0,010 (16,2 %) | 0,013 (20,2 %) |
| Matala | Insertio | chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC | RET C634_ T636dup | 36 | 0,037 | 0,005 (13,8 %) | 0,000 (0,0 %) | 0,00 3 (9,1 %) | 0,006 (15,9 %) | 0,008 (22,9 %) |

NTRK 1–3 ja RET-fuusiot

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

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

| Varianttitaso | Kohdennettu fuusio | n | Keskimääräiset tukevat readit | Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI* |
|---------------|------------------------|-----|-------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------|
| Korkea | LMNA-NTRK1 | 36 | 37,9 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | BCAN-NTRK1 | 36 | 33,6 | 94,4 % (34/36) | (81,9 %, 98,5 %) |
| Korkea | ETV6-NTRK2 | 36 | 24,6 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | TRIM24-NTRK2 | 36 | 36,6 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | ETV6-NTRK3 | 36 | 56,4 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | BTBD1-NTRK3 | 35 | 32,9 | 100,0 % (35/35) | (90,1 %, 100,0 %) |
| Korkea | NCOA4-RET | 36 | 36,7 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | CCDC6-RET | 36 | 33,4 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | Kaikki korkeat fuusiot | 287 | 36,5 | 99,3 % (285/287) | (97,5 %, 99,8 %) |
| Matala | LMNA-NTRK1 | 36 | 13,8 | 94,4 % (34/36) | (81,9 %, 98,5 %) |
| Matala | BCAN-NTRK1 | 36 | 16,9 | 80,6 % (29/36) | (65,0 %, 90,2 %) |
| Matala | ETV6-NTRK2 | 35 | 15,2 | 94,3 % (33/35) | (81,4 %, 98,4 %) |

| Varianttitaso | Kohdennettu fuusio | n | Keskimääräiset tukevat readit | Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI* |
|---------------|------------------------|-----|-------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------|
| Matala | STRN-NTRK2 | 36 | 13,6 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Matala | ETV6-NTRK3 | 36 | 24,8 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Matala | BTBD1-NTRK3 | 36 | 18,1 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| Matala | NCOA4-RET | 36 | 15,8 | 97,2 % (35/36) | (85,8 %, 99,5 %) |
| Matala | KIF5B-RET | 34 | 16,6 | 97,1 % (33/34) | (85,1 %, 99,5 %) |
| Matala | Kaikki matalat fuusiot | 285 | 16,8 | 95,4 % (272/285) | (92,3 %, 97,3 %) |

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

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

| Varianttitaso | Kohdennetut fuusiot | n ¹ | Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI ² |
|---------------|-------------------------|----------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| Korkea | LMNA-NTRK1 | 180 | 100,0 % (180/180) | (97,9 %, 100,0 %) |
| Korkea | BCAN-NTRK1 | 251 | 100,0 % (251/251) | (98,5 %, 100,0 %) |
| Korkea | ETV6-NTRK2 | 251 | 100,0 % (251/251) | (98,5 %, 100,0 %) |
| Korkea | TRIM24-NTRK2 | 216 | 100,0 % (216/216) | (98,2 %, 100,0 %) |
| Korkea | ETV6-NTRK3 | 144 | 100,0 % (144/144) | (97,4 %, 100,0 %) |
| Korkea | BTBD1-NTRK3 | 216 | 100,0 % (216/216) | (98,2 %, 100,0 %) |
| Korkea | NCOA4-RET | 215 | 100,0 % (215/215) | (98,2 %, 100,0 %) |
| Korkea | CCDC6-RET | 251 | 100,0 % (251/251) | (98,5 %, 100,0 %) |
| Korkea | Kaikki fuusiot - korkea | 1724 | 100,0 % (1 724/1 724) | (99,8 %, 100,0 %) |
| Matala | LMNA-NTRK1 | 213 | 100,0 % (213/213) | (98,2 %, 100,0 %) |
| Matala | BCAN-NTRK1 | 249 | 100,0 % (249/249) | (98,5 %, 100,0 %) |
| Matala | ETV6-NTRK2 | 250 | 100,0 % (250/250) | (98,5 %, 100,0 %) |
| Matala | STRN-NTRK2 | 249 | 100,0 % (249/249) | (98,5 %, 100,0 %) |
| Matala | ETV6-NTRK3 | 177 | 100,0 % (177/177) | (97,9 %, 100,0 %) |
| Matala | BTBD1-NTRK3 | 249 | 100,0 % (249/249) | (98,5 %, 100,0 %) |

| Varianttitaso | Kohdennetut fuusiot | n ¹ | Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI ² |
|---------------|--------------------------|----------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| Matala | NCOA4-RET | 213 | 100,0 % (213/213) | (98,2 %, 100,0 %) |
| Matala | KIF5B-RET | 251 | 100,0 % (251/251) | (98,5 %, 100,0 %) |
| Matala | Kaikki fuusiot - matalat | 1851 | 100,0 % (1 851/1 851) | (99,8 %, 100,0 %) |

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

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

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

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

| Varianttitaso | Fuusio | n | Keskimääräiset tukevat readit | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Rinnakkaisnäytteen SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|---------------|--------------|----|-------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------|------------------------------|--------------------|
| Korkea | LMNA-NTRK1 | 36 | 37,9 | 3,52 (9 %) | 3,37 (9 %) | 6,93 (18 %) | 9,04 (24 %) | 12,39 (33 %) |
| Korkea | BCAN-NTRK1 | 36 | 33,6 | 13,75 (41 %) | 7,87 (23 %) | 5,40 (16 %) | 8,95 (27 %) | 18,98 (57 %) |
| Korkea | ETV6-NTRK2 | 36 | 24,6 | 8,03 (33 %) | 3,50 (14 %) | 4,20 (17 %) | 4,86 (20 %) | 10,86 (44 %) |
| Korkea | TRIM24-NTRK2 | 36 | 36,6 | 11,44 (31 %) | 4,24 (12 %) | 6,82 (19 %) | 6,87 (19 %) | 15,57 (43 %) |
| Korkea | ETV6-NTRK3 | 36 | 56,4 | 11,49 (20 %) | 10,20 (18 %) | 9,25 (16 %) | 8,69 (15 %) | 19,93 (35 %) |
| Korkea | BTBD1-NTRK3 | 35 | 32,9 | 1,49 (5 %) | 2,65 (8 %) | 2,16 (7 %) | 10,47 (32 %) | 11,11 (34 %) |
| Korkea | NCOA4-RET | 36 | 36,7 | 4,64 (13 %) | 4,09 (11 %) | 6,17 (17 %) | 5,20 (14 %) | 10,17 (28 %) |
| Korkea | CCDC6-RET | 36 | 33,4 | 7,25 (22 %) | 2,56 (8 %) | 6,53 (20 %) | 5,51 (16 %) | 11,49 (34 %) |
| Matala | LMNA-NTRK1 | 36 | 13,8 | 1,79 (13 %) | 0,00 (0 %) | 2,74 (20 %) | 4,37 (32 %) | 5,47 (40 %) |
| Matala | BCAN-NTRK1 | 36 | 16,9 | 2,92 (17 %) | 2,98 (18 %) | 4,61 (27 %) | 5,82 (34 %) | 8,52 (50 %) |

| Varianttitaso | Fuusio | n | Keskimääräiset tukevat readit | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Rinnakkaisnäytteen n SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|---------------|-------------|----|-------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------|--------------------------------|--------------------|
| Matala | ETV6-NTRK2 | 35 | 15,2 | 0,00 (0 %) | 3,41 (22 %) | 3,83 (25 %) | 4,39 (29 %) | 6,75 (45 %) |
| Matala | STRN-NTRK2 | 36 | 13,6 | 1,77 (13 %) | 0,61 (5 %) | 2,33 (17 %) | 2,57 (19 %) | 3,95 (29 %) |
| Matala | ETV6-NTRK3 | 36 | 24,8 | 6,03 (24 %) | 3,46 (14 %) | 0,00 (0 %) | 6,39 (26 %) | 9,44 (38 %) |
| Matala | BTBD1-NTRK3 | 36 | 18,1 | 0,93 (5 %) | 0,00 (0 %) | 0,00 (0 %) | 6,64 (37 %) | 6,71 (37 %) |
| Matala | NCOA4-RET | 36 | 15,8 | 2,08 (13 %) | 1,03 (7 %) | 0,00 (0 %) | 5,11 (32 %) | 5,61 (36 %) |
| Matala | KIF5B-RET | 34 | 16,6 | 2,07 (12 %) | 0,00 (0 %) | 1,58 (10 %) | 5,83 (35 %) | 6,39 (39 %) |

% CV: Variaatiokertoimen prosenttimäärä.

SD: Keskihajonta.

Tutkimus 2

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

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

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

Positiivisten tunnistusten prosenttimäärät (PPC:t) pienille DNA-varianteille, geenin monistumisille, MSI-korkea (MSI-H) -parametrille ja RNA-varianteille laskettiin yhdistämällä havaintoja sekvenssijajoissa ja testipaikoissa. Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (PNC:t) laskettiin samoin pienille DNA-varianteille, geenin monistumisille ja RNA-varianteille. Kunkin tunnetun kohdevariantin kohdalla yhdistettiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksen saman varianttityypin paneeliosia, jotka sisältävät muita variantteja, joita ei ole johdettu

samasta lähenäytteestä ja jotka eivät täytä kyseisen variantin enemmistöä koskevaa sääntöä (< 50 % tunnistuksista oli positiivisia) testipaikkojen, käyttäjien/laitteiden, päivien, reagenssierien ja sekvenssijojen välillä. Kaksipuoliset 95 %:n luottamusvälit (CI) laskettiin Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Pienet DNA-variantit

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

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

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

| Havaittu varianttitas ^{o1} | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (nukleotidi) | Kohdennettu variantti (aminohappo) | Keskimääräinen VAF ² | Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI ³ |
|-------------------------------------|-----------------|------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------|
| ~2-3 x LOD | DELEETIO | chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGC A_G | EGFR E746_ A750del | 0,112 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |
| ~2-3 x LOD | SNV | chr7_55259515_T_G | EGFR L858R | 0,045 | 100,0 % (38/38) | (90,8 %, 100,0 %) |
| ~2-3 x LOD | DELEETIO | chr22_41574678_GC_ G | EP300 H2324fs*29 | 0,245 | 100,0 % (44/44) | (92,0 %, 100,0 %) |
| ~2-3 x LOD | INSERTIO | chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG | ERBB2 Y772_ A775dup | 0,075 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| ~2-3 x LOD | SNV | chr2_209113112_C_T | IDH1 R132H | 0,155 | 100,0 % (36/36) | (90,4 %, 100,0 %) |
| ~2-3 x LOD | MNV | chr12_25398284_CC_ AT | KRAS G12I | 0,111 | 100,0 % (38/38) | (90,8 %, 100,0 %) |
| ~2-3 x LOD | INSERTIO | chr9_139399350_C_ CG | NOTCH1 R1598fs*12 | 0,146 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| ~2-3 x LOD | DELEETIO | chr10_89720798_ GTACT_G | PTEN T319fs*1 | 0,157 | 100,0 % (44/44) | (92,0 %, 100,0 %) |

| Havaittu varianttitaso ¹ | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti (nukleotidi) | Kohdennettu variantti (aminohappo) | Keskimääräinen VAF ² | Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI ³ |
|-------------------------------------|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| <2 x LOD | INSERTIO | chr17_7578470_C_CGGGCGG | TP53 P152_P153dup | 0,157 | 100,0 % (2/2) | (34,2 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | INSERTIO | chr17_7574029_C_CGGAT | TP53 R333HfsTer5 | 0,154 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |

¹ Varianttitaso laskettu keskimääräisestä havaitusta variantin alleelitaajuudesta.

² Keskimääräinen variantin alleelitaajuus laskettu havaittujen määritysten tuloksista.

³ Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

PNC:t olivat 100 % pienissä DNA-varianteissa.

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

Taulukko 60 Kohdennettujen pienten DNA-varianttien VAF:ien varianssikomponenttianalyysi

| Kohdennettu variantti | N | VAF:n keskiarvo | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV) | Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Ajon SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|------------------------|----|-----------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|----------------|----------------|--------------------|
| chr2_209113112_C_T | 36 | 0,155 | 0,008 (4,9) | 0,006 (4,1) | 0,034 (22,1) | 0,000 (0,0) | 0,016 (10,2) | 0,039 (25,2) |
| chr4_153332910_C_CAGG | 44 | 0,130 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,013 (10,3) | 0,014 (11,1) | 0,008 (6,1) | 0,021 (16,3) |
| chr5_112175675_A_AAG | 48 | 0,100 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,010 (10,4) | 0,003 (2,9) | 0,003 (3,3) | 0,011 (11,3) |
| chr5_112175675_AAG_A | 40 | 0,166 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,024 (14,2) | 0,000 (0,0) | 0,011 (6,7) | 0,026 (15,7) |
| chr5_112175751_CT_C | 28 | 0,181 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,029 (15,8) | 0,019 (10,8) | 0,008 (4,7) | 0,036 (19,7) |
| chr5_112175751_CTTTA_C | 46 | 0,155 | 0,000 (0,0) | 0,009 (5,6) | 0,023 (14,9) | 0,015 (9,7) | 0,008 (5,5) | 0,030 (19,4) |
| chr5_112175951_G_GA | 32 | 0,227 | 0,000 (0,0) | 0,006 (2,5) | 0,034 (15,1) | 0,000 (0,0) | 0,011 (4,9) | 0,036 (16,1) |

| Kohdennettu variantti | N | VAF:n keskiarvo | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV) | Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Ajon SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|-----------------------------------|----|-----------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|----------------|-----------------|--------------------|
| chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGC_A_G | 46 | 0,112 | 0,000 (0,0) | 0,004 (3,8) | 0,015 (13,7) | 0,005 (4,1) | 0,008 (6,9) | 0,018 (16,3) |
| chr7_55259515_T_G | 38 | 0,045 | 0,003 (6,0) | 0,000 (0,0) | 0,012 (27,3) | 0,000 (0,0) | 0,003 (6,8) | 0,013 (28,8) |
| chr7_140453136_A_T | 46 | 0,045 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,016 (34,9) | 0,000 (0,0) | 0,006 (12,2) | 0,017 (36,9) |
| chr7_140453136_AC_TT | 46 | 0,130 | 0,000 (0,0) | 0,004 (2,9) | 0,017 (13,4) | 0,003 (2,6) | 0,006 (4,9) | 0,019 (14,8) |
| chr9_139399350_C_CG | 48 | 0,146 | 0,015 (10,2) | 0,000 (0,0) | 0,012 (8,2) | 0,000 (0,0) | 0,004 (2,8) | 0,020 (13,4) |
| chr10_89720798_GTACT_G | 44 | 0,157 | 0,000 (0,0) | 0,003 (2,0) | 0,021 (13,6) | 0,002 (1,6) | 0,010 (6,4) | 0,024 (15,3) |
| chr12_25398284_CC_AT | 38 | 0,111 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,019 (16,8) | 0,003 (2,5) | 0,008 (7,3) | 0,020 (18,5) |
| chr17_7574002_CG_C | 44 | 0,158 | 0,007 (4,2) | 0,000 (0,0) | 0,021 (13,5) | 0,013 (8,6) | 0,013 (8,2) | 0,029 (18,4) |
| chr17_7574029_C_CGGAT | 48 | 0,154 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,017 (11,0) | 0,006 (3,8) | 0,010 (6,6) | 0,021 (13,4) |
| chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG | 36 | 0,075 | 0,013 (16,9) | 0,006 (8,1) | 0,013 (16,7) | 0,000 (0,0) | 0,004 (4,7) | 0,019 (25,5) |
| chr22_41574678_GC_G | 44 | 0,245 | 0,006 (2,4) | 0,002 (0,6) | 0,019 (7,9) | 0,000 (0,0) | 0,005 (2,1) | 0,021 (8,6) |

Kahden pienen DNA-kohdennetun variantin havaintojen lukumäärä oli liian pieni varianssikomponenttien mallin käyttöön. Näiden kahden kohdennetun variantin kohdalla yleinen keskihajonta oli 0,027 variantille chr1_27024001_C_CG ja 0,001 variantille chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Geenien monistumiset

[Taulukko 61](#) näyttää PPC:t kohdennetuille geenien monistumisille. PPC:t olivat 100,0 % MET:lle ja 100,0 % ERBB2:lle.

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

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

¹ Varianttitaso laskettuna keskiarvoisesta havaitusta kertamuutoksesta.

² Keskimääräinen kertamuutos laskettuna havaituista määritystuloksista.

³ Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

PNC:t olivat 100 % kaikissa geenien monistumisissa.

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

Taulukko 62 Kertamuutoksen varianssikomponenttien analyysi kohdennetuille geenimonistuksille

| Kohdennettu variantti | N | Keskimääräinen kertamuutos | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV) | Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Ajon SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|-----------------------|----|----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|----------------|----------------|--------------------|
| ERBB2 | 47 | 2,33 | 0,02 (0,6) | 0,01 (0,4) | 0,02 (0,9) | 0,01 (0,4) | 0,01 (0,5) | 0,03 (1,3) |
| MET | 48 | 5,14 | 0,05 (1,0) | 0,12 (2,4) | 0,14 (2,6) | 0,00 (0,0) | 0,03 (0,6) | 0,19 (3,7) |

MSI

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

Taulukko 63 TSO Comprehensive (EU) -määrityksen PPC MSI-H-tilan tunnistukselle yhdistetyissä kohdennetuissa paneeliosissa

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

¹ Keskimääräiset havaitut MSI-pisteet laskettuina havaituista määrittystuloksista.

² Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 64 näyttää MSI-pisteiden tulosten varianssikomponenttianalyysin kullekin variaation lähteelle ja kokonaisvariaation kaikissa paneeliosissa, jotka on kohdennettu MSI-H-tilaan.

Taulukko 64 Kohdennettujen MSI-H-paneelijäsenten MSI-pisteiden varianssikomponenttien analyysi

| Paneeliosa | N | Keskimääräiset MSI-pisteet | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV) | Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Ajon SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|------------|----|----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|----------------|----------------|--------------------|
| TPSBD4 | 36 | 60,5 | 0,0 (0) | 0,0 (0) | 2,1 (3) | 0,0 (0) | 2,1 (3) | 3,0 (5) |
| TPSBD6 | 32 | 55,7 | 0,0 (0) | 1,3 (2) | 1,0 (2) | 0,8 (1) | 2,9 (5) | 3,4 (6) |

TMB

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

Taulukko 65 TMB-pisteiden varianssikomponenttien analyysi kohdennetuille TMB-paneeliosille

| Paneeliosa | N | TMB-pisteiden keskiarvo | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV) | Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Ajon SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|------------|----|-------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|----------------|----------------|--------------------|
| TPSBD3 | 28 | 7,6 | 0,2 (2) | 0,0 (0) | 0,8 (10) | 0,0 (0) | 0,5 (7) | 1,0 (13) |
| TPSBD4 | 44 | 63,2 | 0,3 (1) | 0,6 (1) | 0,4 (1) | 0,0 (0) | 0,7 (1) | 1,1 (2) |

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

RNA-variantit

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

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

| Havaittu varianttitaso ¹ | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti | Keskimääräiset tukevat readit ² | Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI ³ |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| ~2–3 x LOD | Fuusio | ACPP-ETV1 | 44,7 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | BCL2-IGHJ5 | 124,9 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | CD74-ROS1;GOPC | 56,6 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | DHX8;ETV4-STAT3 | 48,9 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | EGFR-GALNT13 | 49,8 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | EML4-ALK | 49,3 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | ESR1-CCDC170 | 45,1 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | FGFR1-GSR | 61,1 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | FGFR2-SRPK2 | 53,4 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | FGFR3-TACC3 | 53,5 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | HNRNPUL1-AXL | 58,0 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| <2 x LOD | Fuusio | KIF5B-RET | 11,6 | 91,7 % (44/48) | (80,4 %, 96,7 %) |
| <2 x LOD | Fuusio | MKRN1-BRAF | 33,4 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| <2 x LOD | Fuusio | PAX3-FOXO1 | 70,1 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| <2 x LOD | Fuusio | RAF1-VGLL4 | 15,9 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |

| Havaittu varianttitaso ¹ | Varianttityyppi | Kohdennettu variantti | Keskimääräiset tukevat readit ² | Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) | 95 %:n CI ³ |
|-------------------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|
| ~2–3 x LOD | Fuusio | SPIDR-NRG1 | 51,5 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Fuusio | TMPRSS2-ERG | 43,5 | 97,9 % (47/48) | (89,1 %, 99,6 %) |
| ~2–3 x LOD | Liitosvariantti | EGFR VIII | 64,0 | 100,0 % (46/46) | (92,3 %, 100,0 %) |
| ~2–3 x LOD | Liitosvariantti | MET-eksoni 14:n ohitus | 61,2 | 100,0 % (48/48) | (92,6 %, 100,0 %) |

¹ Varianttitaso laskettuna keskiarvoisista tukevista readeista.

² Keskimääräiset tukevat readit laskettuna havaituista määritystuloksista.

³ Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

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

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

Taulukko 67 Kohdennettujen RNA-varianttien tukevien readien varianssikomponenttianalyysi

| Kohdennettu variantti | N | Keskimääräiset tukevat readit | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV) | Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Ajon SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|-----------------------|----|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|----------------|----------------|--------------------|
| ACPP-ETV1 | 46 | 44,7 | 10,38 (23) | 0,00 (0) | 13,01 (29) | 5,90 (13) | 2,28 (5) | 17,80 (40) |
| BCL2-IGHJ5 | 46 | 124,9 | 38,22 (31) | 13,24 (11) | 29,08 (23) | 9,51 (8) | 8,30 (7) | 51,39 (41) |
| CD74-ROS1;GOPC | 48 | 56,6 | 0,00 (0) | 3,98 (7) | 17,18 (30) | 0,00 (0) | 3,00 (5) | 17,89 (32) |
| DHX8;ETV4-STAT3 | 46 | 48,9 | 18,27 (37) | 13,42 (27) | 17,01 (35) | 0,00 (0) | 1,50 (3) | 28,38 (58) |
| EGFR-GALNT13 | 46 | 49,8 | 0,00 (0) | 6,90 (14) | 14,86 (30) | 2,08 (4) | 2,82 (6) | 16,75 (34) |
| EML4-ALK | 48 | 49,3 | 0,00 (0) | 12,18 (25) | 19,10 (39) | 8,83 (18) | 1,94 (4) | 24,39 (49) |
| ESR1-CCDC170 | 46 | 45,1 | 2,30 (5) | 0,00 (0) | 12,37 (27) | 0,00 (0) | 8,08 (18) | 14,95 (33) |

| Kohdennettu variantti | N | Keskimääräiset tukevat readit | Testipaikan SD (% CV) | Käyttäjän (testipaikka) SD (% CV) | Päivän (testipaikka, käyttäjä) SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Ajon SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|-------------------------------------------------------|----|----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| FGFR1-GSR | 46 | 61,1 | 8,57 (14) | 1,31 (2) | 11,15 (18) | 9,23 (15) | 5,18 (8) | 17,65 (29) |
| FGFR2-SRPK2 | 48 | 53,4 | 3,18 (6) | 10,90 (20) | 15,85 (30) | 15,29 (29) | 3,10 (6) | 24,97 (47) |
| FGFR3-TACC3 | 48 | 53,5 | 17,43 (33) | 0,00 (0) | 12,38 (23) | 5,81 (11) | 3,46 (6) | 22,42 (42) |
| HNRNPUL1-AXL | 48 | 58,0 | 0,00 (0) | 12,15 (21) | 18,22 (31) | 0,00 (0) | 3,96 (7) | 22,26 (38) |
| KIF5B-RET | 48 | 11,6 | 0,89 (8) | 0,00 (0) | 3,97 (34) | 1,44 (12) | 1,09 (9) | 4,45 (38) |
| MKRN1-BRAF | 48 | 33,4 | 6,98 (21) | 8,19 (25) | 13,02 (39) | 6,63 (20) | 4,00 (12) | 18,58 (56) |
| PAX3-FOXO1 | 48 | 70,1 | 12,45 (18) | 10,79 (15) | 17,91 (26) | 3,02 (4) | 2,42 (3) | 24,65 (35) |
| RAF1-VGLL4 | 46 | 15,9 | 1,46 (9) | 1,52 (10) | 3,80 (24) | 4,42 (28) | 1,23 (8) | 6,32 (40) |
| SPIDR-NRG1 | 48 | 51,5 | 4,78 (9) | 0,00 (0) | 10,69 (21) | 5,94 (12) | 3,29 (6) | 13,54 (26) |
| TMPRSS2-ERG | 48 | 43,5 | 5,63 (13) | 8,81 (20) | 9,98 (23) | 0,00 (0) | 6,21 (14) | 15,73 (36) |
| EGFR viii - liitosvariantti | 46 | 64,0 | 12,70 (20) | 0,42 (1) | 17,69 (28) | 0,00 (0) | 2,34 (4) | 21,90 (34) |
| MET-eksonin 14:n ohituksen silmukointivariantti | 48 | 61,2 | 11,42 (19) | 3,43 (6) | 19,84 (32) | 7,55 (12) | 2,10 (3) | 24,43 (40) |

Laboratorion sisäinen tarkkuus

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

Tutkimus 1

Laboratorion sisäinen tarkkuus arvioitiin NTRK1–3-fuusioiden (matalan graduksen gliooma, glioblastooma multiforme, myofibroblastinen sarkooma, sekretorinen rintasyöpä), RET-fuusioiden (kilpirauhassyöpä ja ihokudos tuntemattomasta syövästä) ja RET:n pienten DNA-varianttien (medullaarinen kilpirauhassyöpä) osalta osoitetuista syövästä saaduista FFPE-kudoksista. Kukin näyte testattiin kahdella varianttitasolla: ~1 x LoD (matala varianttitaso) ja ~2–3 x LoD (korkea varianttitaso), poikkeuksena näyte, jossa oli CCDC6-RET ja joka testattiin vain matalalla varianttitasolla. Kukin näytteistä kullakin testitasolla ajettiin duplikaatteina kussakin kirjaston valmistelutapahtumassa kolmen (3) käyttäjän kautta. Kukin käyttäjä aloitti kirjaston valmistelun kolmena (3) ei-peräkkäisenä aloituspäivänä ja sekvensoi kolmella (3) tähän varatulla NextSeq 550Dx -laitteella. Kolme (3) reagenssierää testattiin, ja havaintoja saatiin 54 tasoa kohden. Joillakin tasoilla oli alle 54 havaintoa kelvottomien kirjastojen vuoksi.

Kvalitatiivinen analyysi

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

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

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

Taulukko 68 Kvalitatiiviset tulokset kohdennetulle DNA-variantille

| Varianttitaso | Variantti | Varianttityyppi | VAF:n keskiarvo | PPC (95 %:n CI) | PNC (95 %:n CI) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|------------------------------------|----------------------------------------|
| Matala (noin 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 | DELEETIO | 0,048 | 87,0 % (47/54) (75,6–93,6 %) | 100,0 % (215/215) (98,2–100,0 %) |
| | RET C618R | SNV | 0,045 | 94,4 % (51/54) (84,9–98,1 %) | 100,0 % (215/215) (98,2–100,0 %) |
| | RET M918T | SNV | 0,042 | 96,2 % (51/53) (87,2–99,0 %) | 100,0 % (216/216) (98,3–100,0 %) |
| | RET D631_L633delinsE* | DELEETIO | 0,056 | 98,1 % (53/54) (90,2–99,7 %) | 100,0 % (215/215) (98,2–100,0 %) |

| Varianttitaso | Variantti | Varianttityyppi | VAF:n keskiarvo | PPC (95 %:n CI) | PNC (95 %:n CI) |
|----------------------------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
| Korkea (noin 3x havaitsemisraja) | RET C634Y | MNV | 0,095 | 100,0 % (54/54) (93,4–100,0 %) | 100,0 % (192/192) (98,0–100,0 %) |
| | RET D898_E901del | DELEETIO | 0,088 | 100,0 % (54/54) (93,4–100,0 %) | 100,0 % (192/192) (98,0–100,0 %) |
| | RET C618R | SNV | 0,146 | 100,0 % (54/54) (93,4–100,0 %) | 100,0 % (192/192) (98,0–100,0 %) |
| | RET M918 | SNV | 0,078 | 100,0 % (52/52) (93,1–100,0 %) | 100,0 % (194/194) (98,1–100,0 %) |
| | RET D631_L633delinsE* | DELEETIO | 0,161 | 100,0 % (32/32) (89,3–100,0 %) | 100,0 % (214/214) (98,2–100,0 %) |

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

Taulukko 69 Kohdennettujen RNA-fuusioiden kvalitatiiviset tulokset

| Varianttitaso | Fuusio | Keskimääräiset tukevat readit | PPC (95 %:n CI) | PNC (95 %:n CI) |
|---------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|
| Matala | 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) |
| | ETV6-NTRK3 (FFPE-solulinja) | 23,1 | 98,1 % (53/54) (90,2 %, 99,7 %) | (99,3 %, 100,0 %) |
| | NCOA4-RET | 13,3 | 90,7 % (49/54) (80,1 %, 96,0 %) | 100,0 % (537/537) (99,3 %, 100,0 %) |
| | CCDC6-RET | 18,7 | 98,1 % (53/54) (90,2 %, 99,7 %) | 100,0 % (591/591) (99,4 %, 100,0 %) |

| Varianttitaso | Fuusio | Keskimääräiset tukevat readit | PPC (95 %:n CI) | PNC (95 %:n CI) |
|---------------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|
| Korkea | TPM3-NTRK1 | 57,1 | 100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %) | 100,0 % (481/481) (99,2 %, 100,0 %) |
| | BCAN-NTRK1 | 53,2 | 100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %) | 100,0 % (535/535) (99,3 %, 100,0 %) |
| | ETV6-NTRK2 | 52,0 | 100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %) | 100,0 % (535/535) (99,3 %, 100,0 %) |
| | ETV6-NTRK3 | 41,7 | 100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %) | 100,0 % (481/481) (99,2 %, 100,0 %) |
| | ETV6-NTRK3 (FFPE-solulinja) | 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 | Ei sovellu | Ei testattu | 100,0 % (589/589) (99,4 %, 100,0 %) |

Kvantitatiivinen analyysi

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

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

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

| VAF-taso | Variantti | Varianttityyppi | Pätevien yritysten lkm | VAF:n keskiarvo | Käyttäjä SD (% CV) | Laite SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Jäännös SD (% CV) | Yhteensä SD (% CV) |
|-------------------------|-----------------------|-----------------|------------------------|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|------------------|-------------------|--------------------|
| Matala (noin 1x LoD) | RET D898_ E901del | DELEETIO | 54 | 0,048 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,004 (8,7) | 0,014 (30,0) | 0,015 (31,2) |
| | RET C618R | SNV | 54 | 0,046 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,014 (31,3) | 0,014 (31,3) |
| | RET M918T | SNV | 53 | 0,042 | 0,000 (0,0) | 0,001 (3,0) | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,011 (25,6) | 0,011 (25,7) |
| | RET C634Y | MNV | 54 | 0,028 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,001 (3,3) | 0,000 (0,0) | 0,009 (30,7) | 0,009 (30,9) |
| | RET D631_ L633delinsE | DELEETIO | 54 | 0,056 | 0,000 (0,0) | 0,002 (3,0) | 0,006 (11,6) | 0,000 (0,0) | 0,010 (18,5) | 0,012 (22,0) |

| VAF-taso | Variantti | Varianttityyppi | Pätevien yritysten lkm | VAF:n keskiarvo | Käyttäjä SD (% CV) | Laite SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Jäännös SD (% CV) | Yhteensä SD (% CV) |
|----------------------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Korkea (noin 3x havaitsemisraja) | RET D898_ E901del | DELEETIO | 54 | 0,088 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,001 (1,4) | 0,006 (7,0) | 0,017 (19,2) | 0,018 (20,5) |
| | RET C618R | SNV | 54 | 0,146 | 0,003 (1,7) | 0,000 (0,0) | 0,020 (13,7) | 0,002 (1,1) | 0,018 (12,6) | 0,027 (18,7) |
| | RET M918T | SNV | 52 | 0,078 | 0,002 (3,1) | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,007 (9,1) | 0,018 (23,1) | 0,020 (25,0) |
| | RET C634Y | MNV | 54 | 0,095 | 0,000 (0,0) | 0,002 (2,5) | 0,002 (2,1) | 0,000 (0,0) | 0,014 (15,0) | 0,015 (15,3) |
| | RET D631_ L633delinsE | DELEETIO | 52* | 0,164 | 0,000 (0,0) | 0,000 (0,0) | 0,005 (3,0) | 0,000 (0,0) | 0,020 (12,1) | 0,020 (12,4) |

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

| Tukevien readien taso | Fuusio | Pätevien yritysten lkm | Keskimääräiset tukevat readit | Käyttäjän SD (% CV) | Laitteen SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Jäännöksen SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|-----------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|----------------|------------------|----------------------|--------------------|
| Matala | 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 (solulinja) | 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) |

| Tukevien readien taso | Fuusio | Pätevien yritysten lkm | Keskimääräiset tukevat readit | Käyttäjän SD (% CV) | Laitteen SD (% CV) | Erän SD (% CV) | Päivän SD (% CV) | Jäännöksen SD (% CV) | SD yhteensä (% CV) |
|-----------------------|---------------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------|----------------|------------------|----------------------|--------------------|
| Korkea | 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 (solulinja) | 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) |

Tutkimus 2

Laboratorion sisäinen tarkkuus arvioitiin TMB:lle ja MSI:lle. Viittä NSCLC FFPE DNA -näytettä TMB:lle ja seitsemää CRC FFPE -näytettä MSI:lle, mukaan lukien sekä mikrosatelliittistabiili (MSS) että MSI-korkea (MSI-H), käytettiin tarkkuuden arvioimiseksi eri tasoilla pisteiden koko alueella. Kukin näytteistä ajettiin duplikaatteina kolmella (3) käyttäjällä, kolmena (3) päivänä, kolmen (3) kirjaston valmistelulla kullekin kolmelle (3) reagenssierälle käyttämällä kolmea NextSeq 550Dx -laitetta, jolloin saatiin 54 tasokohtaista havaintoa.

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

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

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

| Taso | TMB-pisteiden keskiarvo | Pätevien yritysten lkm | Käyttäjä SD (% CV) | Laitte SD (% CV) | Erä SD (% CV) | Päivä SD (% CV) | Jäännös SD (% CV) | Yhteensä SD (% CV) |
|------|-------------------------|------------------------|--------------------|------------------|---------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| L1 | 0,3 | 52 | 0,00 (0 %) | 0,06 (23 %) | 0,00 (0 %) | 0,08 (30 %) | 0,40 (146 %) | 0,41 (151 %) |
| L2 | 8,4 | 53 | 0,00 (0 %) | 0,14 (2 %) | 0,00 (0 %) | 0,00 (0 %) | 0,71 (8 %) | 0,73 (9 %) |
| L3 | 15,1 | 54 | 0,00 (0 %) | 0,00 (0 %) | 0,20 (1 %) | 0,00 (0 %) | 1,16 (8 %) | 1,18 (8 %) |
| L4 | 20,3 | 53 | 0,00 (0 %) | 0,00 (0 %) | 0,06 (0 %) | 0,00 (0 %) | 0,56 (3 %) | 0,57 (3 %) |
| L5 | 42,3 | 54 | 0,00 (0 %) | 0,00 (0 %) | 0,15 (0 %) | 0,00 (0 %) | 1,37 (3 %) | 1,38 (3 %) |

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

| MSI-tila | Taso | Keskimääräiset MSI-pisteet (%) | Pätevien yritysten lkm | Käyttäjä SD (% CV) | Laitte SD (% CV) | Erä SD (% CV) | Päivä SD (% CV) | Jäännös SD (% CV) | Yhteensä SD (% CV) |
|-------------------------|------|--------------------------------|------------------------|--------------------|------------------|---------------|-----------------|-------------------|--------------------|
| MS-Stable (MS-Stabiili) | L1 | 0,80 | 53 | 0,35 (43 %) | 0,00 (0 %) | 0,15 (18 %) | 0,00 (0 %) | 0,52 (66 %) | 0,64 (81 %) |
| | L2 | 5,90 | 53 | 0,47 (8 %) | 0,00 (0 %) | 0,84 (14 %) | 0,00 (0 %) | 1,26 (21 %) | 1,58 (27 %) |

| MSI-tila | Taso | Keskimääräiset MSI-pisteet (%) | Pätevien yritysten lkm | Käyttäjä SD (% CV) | Laite SD (% CV) | Erä SD (% CV) | Päivä SD (% CV) | Jäännös SD (% CV) | Yhteensä SD (% CV) |
|------------|------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| MSI-korkea | L3 | 48,68 | 53 | 0,19 (0 %) | 0,00 (0 %) | 0,00 (0 %) | 1,19 (2 %) | 2,48 (5 %) | 2,76 (6 %) |
| | L4 | 56,85 | 54 | 1,66 (3 %) | 0,00 (0 %) | 1,92 (3 %) | 0,00 (0 %) | 3,07 (5 %) | 3,98 (7 %) |
| | L5 | 72,62 | 54 | 0,00 (0 %) | 0,47 (1 %) | 0,34 (0 %) | 0,62 (1 %) | 1,28 (2 %) | 1,54 (2 %) |
| | L6 | 75,29 | 54 | 0,00 (0 %) | 0,42 (1 %) | 0,09 (0 %) | 0,00 (0 %) | 1,46 (2 %) | 1,52 (2 %) |
| | L7 | 78,38 | 54 | 0,00 (0 %) | 0,00 (0 %) | 0,00 (0 %) | 0,45 (1 %) | 0,95 (1 %) | 1,06 (1 %) |

TMB-pisteiden variaatio kasvaa yleensä keskiarvon myötä odotetusti laskettujen tietojen teoreettisista jakaumista. MSI-pisteiden variaatio tasoille, jotka ovat lähellä MSI-pisteitä = 50, ovat suurempia kuin MSI-pisteiden variaatio lähempänä 0:aa tai 100:aa, yhdenmukaisesti teoreettisten jakaumien vaihtelevuuden kanssa. Jäännöskomponentti pysyi suurimpana kokonaisvarianssin aiheuttajana sekä MSI- että TMB-pisteille, mikä tukee päätelmää, että pisteet ovat vakaita käyttäjille, erille, laitteille ja päiville.

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

Taulukko 74 C5-C95-välit MSI:lle

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

Koska sekä MSI että TMB ovat kuitenkin monimutkaisia biomarkkereita, analyttinen suorituskyky voi vaihdella näytekohtaisesti. Tämä tarkoittaa, että TMB-variaatio ei riipu vain TMB-arvosta, mutta myös näytteen varianttien koostumuksesta, kuten varianttityypistä (SNV, Indel) ja VAF-tasosta (inkluusiorajan läheisyys). Samoin MSI-variaatio ei riipu vain MSI-arvosta, vaan myös näytekohtien koostumuksesta, kuten instabiilien kohtien lukumäärästä ja instabiiliuden määrästä kohtaa kohti.

Kasvainsisällön vaikutus TMB- ja MSI-pisteisiin arvioitiin. Useimmissa näytteissä kasvainsisällöllä ≥ 30 % oli merkityksetön vaikutus TMB-pisteisiin, kun määränä oli yli noin 10 megaemästä/mutaatio. TMB-pisteet pysyivät suhteellisen muuttumattomina kasvainsisällön kasvaessa. MSI-H-näytteissä kasvainsisältö näytti positiivista ja lineaarista korrelaatiota MSI-pisteiden kanssa. MSI-H-näytteet pysyvät keskimäärin MSI-H:na, kun kasvainsisältö oli ≥ 30 %. Endometriaaliset näytteet käyttäytyivät selvästi eri tavalla kuin muut kudostyyppit, ja niiden havaittiin tarvitsevan enemmän kasvainsisältöä, jotta ne voitiin tunnistaa MSI-H:ksi.

Kasvaimen profiloinnin tarkkuus

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen varianttien tunnistamista verrattiin viitemenetelmien tuloksiin. DNA:n pieniä variantteja ja TMB:tä vertailtiin ulkoiseen validoituun koko eksomin NGS-menetelmään. Geenimonistuksia vertailtiin samaan koko eksomin NGS-menetelmään tai validoituun in situ -kaksoishybridisaation (DISH) menetelmään HER2:n monistumisille. MSI arvioitiin validoitua MSI-PCR-testiä vastaan. RNA-silmukointivariantteja vertailtiin validoituun kvantitatiivisen PCR:n (qPCR) menetelmään. ROS1- ja ALK-fuusioita vertailtiin validoituihin FISH-määrityksiin. Kaikkia muita fuusioita verrattiin yhdistelmämenetelmään, johon kuuluu validoitu RNA:n koko eksomin NGS-määritys (RNGS1), kohdennettu NGS-paneeli (RNGS2) ja droplet-digital-PCR (ddPCR).

Pienen DNA-variantin tunnistus

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

Taulukko 75 Yhtäpitävyyden yhteenvedo varianttintunnistuksille ituradan tai somaattisen tilan mukaan

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

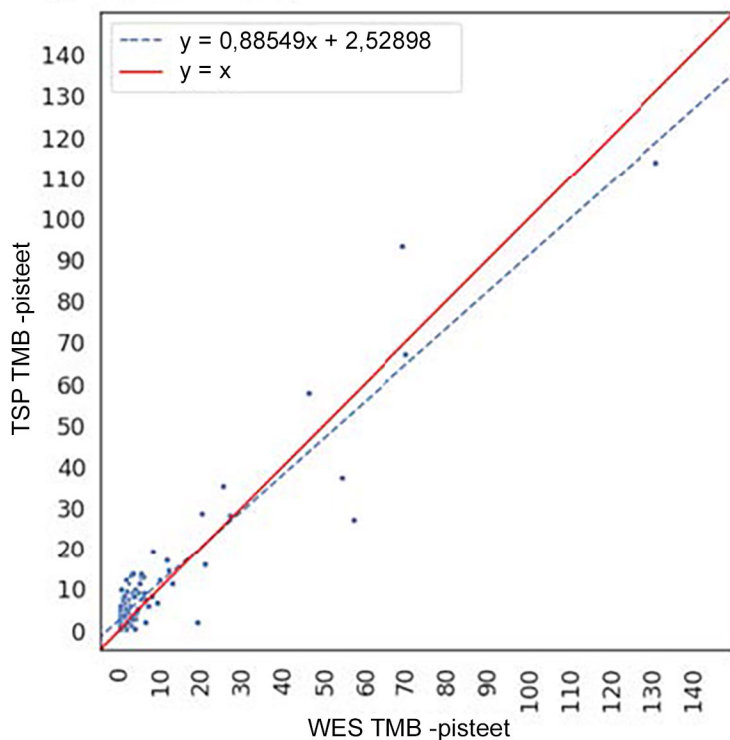
TSO Comprehensive (EU) tunnisti yhteensä 426 somaattista varianttia, joita WES-menetelmä ei tunnistanut. Kahdellasadallaneljällä (48 %) näistä varianteista oli variantin alleelitaajuuksia, jotka olivat WES-menetelmän tunnistamisen kynnyksarvon alapuolella. Jäljellä olevissa potentiaalisesti väärin positiivisten varianteissa oli

näyttöä variantin tunnistuksesta WES-menetelmässä matalalla tuella. Lisäksi monella variantilla oli hyvin alhaisen tason WES-näyttö kaltaistetuissa normaaleissa näytteissä. Tämä viittaa siihen, että WES ei huomannut näitä variantteja kasvaimessa kasvaimen normaalikontaminaation vuoksi.

Kasvaimen mutaatiokuorman tunnistus

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

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



Geenien monistumisen tunnistus

TSO Comprehensive (EU) -määrityksen geenien monistumisen tunnistamista vertailtiin saman WES-määrityksen tuloksiin käyttämällä joko kasvaimen normaaleja vastaavia näytteitä tai vain kasvaimen näytteitä. Näytteitä oli yhteensä 420, joista 183:a käytettiin ortogonaalisessa kasvain/normaali-menetelmässä ja 237:ssä käytettiin pelkkää kasvaimen menetelmää. Näytteet olivat 14 kudostyyppistä, ja ne sisälsivät 55 geenin monistumisia. TSO Comprehensive (EU) ilmoittaa geenien monistumiset MET- ja ERBB2-geeneistä. Tarkkuus arvioitiin kuitenkin kaikille 55 geenille. Taulukko 76 esittää yhteenvedon geenien monistumisen tunnistamisesta.

Taulukko 76 Geenien monistumisen tunnistukset

| | WES-positiivinen | WES-negatiivinen |
|--------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| TSO Comprehensive (EU) -positiivinen | 337 | 415 |
| TSO Comprehensive (EU) -negatiivinen | 28 | 24 000 |
| Yhteensä | 365 | 24 415 |
| Yhtäpitävyysprosentti | PPA: 92 % (337/365) 95 %:n CI: [89 %, 95 %] | NPA: 98,3 % (24 000/24 415) 95 %:n CI: [98,1 %, 98,5 %] |

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

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

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

Mikrosatelliitti-instabiiliuden tunnistus

Mikrosatelliitti-instabiiliuden tunnistamista TSO Comprehensive (EU) -määrityksessä vertailtiin sellaisen validoidun MSI-PCR-testin tuloksiin, jossa käytetään kaltaistettuja kasvainnäytteitä ja normaaleja näytteitä testauksessa. Yhteensä vertailtiin 195:tä näytettä, jotka täyttivät vaaditun kasvainsisällön, ≥ 30 %, ja edustivat 14:ta kudostyyppiä. MSI-PCR:llä arvioidaan 5 kohtaa, ja sillä on 3 tulosta – MSS (ei instabiileja kohtia), MSI-matala (yksi instabiili kohta) ja MSI-korkea (MSI-H) (kaksi tai useampi instabiili kohtaa). TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä arvioidaan enintään 130 mikrosatelliittikohtaa ja luokitellaan näytteet vain MSS- tai MSI-korkea-kohteiksi (≥ 20 % instabiileista kohdista). MSI-matala ryhmitettiin MSS-tulosten kanssa MSI-PCR-menetelmää varten. [Taulukko 78](#) esittää yhtäpitävyyksanalyysin.

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

| MSI-instabiilius | PCR MSI-korkea | PCR MSI-matala | PCR MSS |
|------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------|
| TSO Comprehensive (EU) Instabiili (MSI-korkea) | 40 | 2 | 0 |
| TSO Comprehensive (EU) Stabiili (MSS) | 3 | 0 | 150 |
| Yhteensä | 43 | 2 | 150 |
| Yhtäpitävyysprosentti | PPA: 93 % (40/43) 95 %:n CI: [81 %, 98 %] | NPA: 99 % (150/152) 95 %:n CI: [95 %, > 99 %] | |

RNA:n silmukointivariantin tunnistus

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

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

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

RNA-fuusion tunnistus

Vertailu yhdistelmämenetelmään

TSO Comprehensive (EU) -fuusioita vertailtiin yhdistelmämenetelmään, joka koostui RNA:n koko eksomin sekvensoinnista, käyttäen NGS-paneelia (RNGS1), kohdennettua NGS-fuusiopaneelia (RNGS2) ja droplet-digital-PCR-menetelmää (ddPCR).

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

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

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

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

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

Taulukko 80 esitetään fuusioille yhdistetyt yhtäpitävyydestulosten menetelmät RNGS1, RNGS2 ja ddPCR.

63 fuusiota, jotka olivat yhteneväisiä yhdistelmämenetelmän kanssa, edustivat 43:a geeniä TSO Comprehensive (EU) -paneelissa. Fuusiot ovat kuitenkin kelpoisia raportoimaan vain 23 geenistä, jotka on osoitettu [TSO Comprehensive \(EU\) -analyysin geenipaneeli sivulla 2](#).

Taulukko 80 TSO Comprehensive (EU) -menetelmän ja yhdistelmämenetelmän tulosten välinen ristiintaulukointi RNA-fuusioille (253 näytettä)

| Fuusiot | Yhdistelmämenetelmän positiivinen | Yhdistelmämenetelmän negatiivinen |
|--------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| TSO Comprehensive (EU) -positiivinen | 63 ¹ | 18 |
| TSO Comprehensive (EU) -negatiivinen | 14 ² | 13 821 |
| Yhteensä | 77 | 13 839 |
| Yhtäpitävyysprosentti | PPA: 82 % (63/77) 95 %:n CI: [72 %, 89 %] | NPA: 99,9 % (13821/13839) 95 %:n CI: [99,8 %, 99,9 %] |

¹ 63 TSO Comprehensive (EU) oikeaa positiivista = 9 positiivista, jotka ovat yhtäpitäviä RNGS1:n kanssa + 13 positiivista, jotka ovat yhtäpitäviä RNGS2:n kanssa + 41 positiivista, jotka ovat yhtäpitäviä ddPCR:n kanssa.

² 14 TSO Comprehensive (EU) väärää negatiivista = 4 negatiivista, jotka eivät ole yhtäpitäviä RNGS1:n kanssa, + 1 negatiivinen, joka ei ole yhtäpitävä RNGS2:n kanssa, + 9 negatiivista, jotka eivät ole yhtäpitäviä ddPCR:n kanssa.

Vertailu FISH-menetelmään ROS1- ja ALK-fuusioille

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

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

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

Näytteen kelpoisuus

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

Taulukko 82 Näytteen kelpoisuus

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

Yhteenveto analyttisestä validoinnista kasvaimen profiloitaväittämille

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

- Pienet DNA-variantit —SNV:t, MNV:t, insertiot ja deleetiot
- TMB
- MSI
- MET- ja ERBB2 (HER2) -geenien monistumiset (katso [TSO Comprehensive \(EU\) -analyysin geenipaneeli sivulla 2](#)).
- 23 geeniä, joiden fuusiot voidaan tunnistaa (katso [TSO Comprehensive \(EU\) -analyysin geenipaneeli sivulla 2](#)).
- EGFR- ja MET-silmukointivariantit (katso [TSO Comprehensive \(EU\) -analyysin geenipaneeli sivulla 2](#)).

NTRK, kliininen suorituskyky

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

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

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

Tarkkuustutkimus NTRK1-, NTRK2- ja NTRK3-fuusion tunnistamiseksi

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

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

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

Taulukko 83 esittää 499 näytteen tulosten ristiintaulukoinnin. Niistä 499 näytteestä 85 näytteellä oli virheellisiä TSO Comprehensive (EU) -määritystuloksia; näistä 85:stä 53 näytti myös virheellisiä ortogonaalisen menetelmän tuloksia. Ylimääräisillä 7 näytteellä oli kelvottomat ortogonaalisen menetelmän tulokset. Näin ollen 407 näytteellä 499 näytteestä oli kelvolliset tulokset molemmissa menetelmissä.

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

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

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

Taulukko 84 esittää yhtäpitävyysanalyysit, pois lukien ja sisältäen kelvottomat TSO Comprehensive (EU) -määritystulokset. Ilman kelvottomia TSO Comprehensive (EU) -määritystuloksia PPA oli 96,6 % (114/118; 95 %:n CI: 91,5 % – 99,1 %) ja NPA oli 94,5 % (273/289; 95 %:n CI: 91,2 % – 96,8 %).

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

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

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

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

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

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

NAVIGATE NCT02576431- ja SCOUT NCT02637687 -tutkimuksiin otetaan yhä potilaita. Tietojen eräpäivään, 15. heinäkuuta 2019, mennessä mukaan oli otettu 279 potilasta. 279 potilaasta 208 oli NTRK-fuusiopositiivisia. 208 positiivisesta potilaasta 164 muodosti larotrektrinibi ePAS4:n.

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

Näytteen laskenta

Näytesarja edusti laajaa valikoimaa kasvaintyyppistä ja pediatrien ja aikuispotilaiden näytteitä.

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

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

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

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

Yhtäpitävyytulokset

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

437 näytteestä, jotka testattiin TSO Comprehensive (EU) -määrityksellä, 24:llä oli ei-vastaavia tuloksia LT:iden kanssa: 15 oli positiivisia LT:iden mukaan ja negatiivisia TSO Comprehensive (EU) -määrityksen mukaan ja 9 oli negatiivisia LT:iden mukaan ja positiivisia TSO Comprehensive (EU) -määrityksen mukaan. 24 epäyhteneväisistä näytteistä 8 testattiin DNA NGS LT -menetelmällä, 14 RNA NGS LT -menetelmällä ja 2 FISH:illä.

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

Kliinisen tehokkuuden tulokset

ePAS4:ssa larotrektrinibin tehokkuus TSO Comprehensive (EU) -määrityksen positiivisessa, LT-positiivisessa väestössä (97 potilasta, ORR=78,4 %, 95 %:n CI [68,8 %, 86,1 %]) oli samankaltainen kuin larotrektrinibin tehokkuus ePAS4-kokonaisväestössä (164 potilasta, ORR=72,6 %, 95 %:n CI [65,1 %, 79,2 %]) (Taulukko 88). 97:stä TSO Comprehensive (EU) -määrityksen positiivisesta potilaasta ePAS4:ssa 28 (28,9 %) potilasta saavutti täydellisen vasteen / täydellisen kirurgisen vasteen ja 48 (49,5 %) potilasta saavutti osittaisen vasteen. 13:sta TSO Comprehensive (EU) -määrityksen negatiivisesta, LT-positiivisesta väestöstä, 1 (7,7 %) osoitti täydellistä vastetta ja 2 (15,4 %) osoitti osittaista vastetta larotrektrinibihoitoon.

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

| | | LT-fuusion positiivinen N=164 | TSO Comprehensive (EU) Positiivinen ja LT- positiivinen N=97 | TSO Comprehensive (EU) Negatiivinen ja LT- positiivinen N=13 |
|----------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Paras kokonaisvaste, n (%) | Täydellinen vaste | 31 (18,9 %) | 22 (22,7 %) | 1 (7,7 %) |
| | Täydellinen kirurginen vaste | 8 (4,9 %) | 6 (6,2 %) | 0 |
| | Osittainen vaste | 80 (48,8 %) | 48 (49,5 %) | 2 (15,4 %) |
| | Stabiili sairaus | 25 (15,2 %) | 13 (13,4 %) | 4 (30,8 %) |
| | Etenevä sairaus | 13 (7,9 %) | 6 (6,2 %) | 5 (38,5 %) |
| | Ei voida arvioida | 7 (4,3 %) | 2 (2,1 %) | 1 (7,7 %) |
| Kokonaisvasteen määrä | Potilaiden lukumäärä, n | 164 | 97 | 13 |
| | Potilaiden lukumäärä, joilla CR + sCR + PR, n | 119 | 76 | 3 |
| | ORR % (95 %:n CI*) | 72,6 % (65,1 %, 79,2 %) | 78,4 % (68,8 %, 86,1 %) | 23,1 % (5,0 %, 53,8 %) |

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

* Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettiin (eksaktilla) Clopper-Pearsonin menetelmällä.

54 potilaalla on puuttuvat TSO Comprehensive (EU) -määrityksen tulokset.

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

Lähdeviitteet

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

Versiohistoria

| Tarkistus | Päivämäärä | Muutoksen kuvaus |
|-----------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| v07 | Tammikuu 2024 | <ul style="list-style-type: none"> Lisätty tietoja kohtaan Toimenpiteen rajoitukset: <ul style="list-style-type: none"> Nekroottisen kudoksen ja kasvainsisällön näytevaatimukset MSI-korkea-parametrin ja somaattisten ajamutaatioiden osalta Hemoglobiinin mahdollisesti aiheuttama häiriö RET-geenin ja fuusion tunnistuksen havaitsemisrajat geenin merkittävien rajojen ulkopuolella. Geenien deleetioita ei raportoida. Päivitetty käytettäväksi TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager -ohjelmiston version 2.3.7 kanssa. Lisätty tietoja tarvittavista mutta ei toimitetuista laitteista ja materiaaleista, mukaan lukien kaksi ultrasonikaattorin lisämääritystä. Näytetiedot on päivitetty: <ul style="list-style-type: none"> Nekroottisen kudoksen pitoisuus Proteinaasi K:n ja hemoglobiinin vaikutukset Objekttilasille preparoitujen FFPE-näytteiden ja puhdistetun nukleiinihapon säilytys Lisätty tietoja reagenssien käsittelyyn, työnkulun ja ajon laadunvalvonnan vianmäärityksen parantamiseksi. Lisätty konteksti ja selvennys suoritusominaisuuksiin: <ul style="list-style-type: none"> Ristikontaminaatio Nukleiinihapon uuttamispakkauksen arviointi Häiritsevät aineet Nukleiinihapon ja objekttilasille preparoidun FFPE-näytteen stabiilius NTRK, kliininen suorituskyky Sanamuodot ja kieliopilliset rakenteet on päivitetty |
| v06 | Helmikuu 2023 | <ul style="list-style-type: none"> Rajoitukset-osion lisälauseet Kielipäivitykset kielenhuoltoon, kielioppiin ja selkeyteen Taulukoiden 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 korjaus Ilmoitus saostumien esiintymisestä FSM-reagenssissa Päivitetty PCR-laitteen ja kaukalon teknisiä tietoja väline- ja materiaaliluettelossa |
| v05 | Syyskuu 2022 | Päivitetty tutkimuksen 2 toistettavuustaulukot |
| v04 | Kesäkuu 2022 | <ul style="list-style-type: none"> Lisättiin TSO Comprehensive analysis module v2.3.5 -PN:t Poistettiin TSO Comprehensive -analyysimoduuli v2.3.3 -PN:t Päivitetty terminologia kohdassa Tyhjän kohdan raja |

| Tarkistus | Päivämäärä | Muutoksen kuvaus |
|-----------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| v03 | Huhtikuu 2022 | <ul style="list-style-type: none">• Lisättiin NTRK-fuusioihin liittyvät suorituskykyominaisuuksien tiedot• Lisättiin merkintä FOR EXPORT ONLY (VAIN VIENTIIN)• Päivitettiin käyttötarkoituksilauseke NTRK1-3 CDx -väitteen lisäämiseksi• Tuotekomponenttien tietoja laajennettiin sisältämään ohjelmistokomponenttien PN:t |
| v02 | Helmikuu 2022 | <ul style="list-style-type: none">• Korjattiin taulukon viitevirhe• Lisättiin rajoitus, joka liittyy ituradan ja somaattisiin variantteihin• Selkeytettiin kielellistä esitysasua geenin monistumisen havaitsemisesta |
| v01 | Joulukuu 2021 | <ul style="list-style-type: none">• Päivitettiin menetelmän rajoitukset• Selkeytettiin magneettisen jalustan ja PCR-laitteen teknisiä tietoja, jotka ovat laite- ja materiaaliluetteloissa |
| v00 | Marraskuu 2021 | Ensimmäinen julkaisu |

Patentit ja tavaramerkit

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

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

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

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

© 2024 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

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

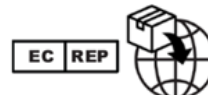
Yhteystiedot



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

CE

IVD



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
The Netherlands

Tuotteiden merkinnät

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