

TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

Uputstvo u pakovanju

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIČKU UPOTREBU. SAMO ZA IZVOZ.

Namena

TruSight Oncology Comprehensive (EU) je *in vitro* dijagnostički test koji koristi ciljano sekvenciranje sledeće generacije za detekciju varijanti u 517 gena pomoću nukleinskih kiselina ekstrahovanih iz uzoraka tumorskog tkiva fiksiranih formalinom, ugrađenih u parafinu (FFPE) od pacijenata sa karcinomom sa solidnim malignim neoplazmima pomoću instrumenta Illumina® NextSeq™ 550Dx. Test se može koristiti za detekciju pojedinačnih nukleotidnih varijanti, multinukleotidnih varijanti, insercija, delecija i amplifikacija gena iz DNK, i fuzije gena i varijanti spajanja iz RNK. Test takođe izveštava o rezultatu opterećenosti tumora mutacijama (TMB) i statusu nestabilnosti mikrosatelita (MSI).

Test je namenjen kao prateća dijagnostika za identifikaciju pacijenata sa karcinomom za lečenje ciljanom terapijom navedenom u [Tabela 1](#), u skladu sa odobrenim oznakama terapijskog proizvoda. Pored toga, test je namenjen za pružanje informacija o profilisanju tumora koje koriste kvalifikovani zdravstveni radnici u skladu sa profesionalnim smernicama i nije konačan ili propisan za označenu upotrebu bilo kog specifičnog terapijskog proizvoda.

Tabela 1 Indikacije za prateću dijagnostiku

Tip tumora	Biomarkeri	Ciljana terapija
Solidni tumori	NTRK1, NTRK2 i NTRK3 Fuzije gena	VITRAKVI® (larotrectinib)

Rezime i objašnjenje analize

Klinički opis

Karcinom je vodeći uzrok smrti širom sveta i ima potencijal da nastane u bilo kom tkivu.¹ Analiza genetske osnove tumora je važna za identifikaciju pacijenata koji mogu imati koristi od ciljanih terapija, kao i za razvoj novih metoda lečenja. Brojni geni su uključeni u uzročnost ili progresiju tumora, a mnogi tumori nose različite varijante koje utiču na ove gene i njihove funkcije. Ove varijante mogu uključivati mutacije gena kao što su varijante jednog nukleotida (SNV), varijante multinukleotida (MNV), insercije ili delecije, amplifikacije gena, fuzije gena i varijante spajanja. Još jedna posledica tumorskih mutacija gena je prezentacija neoantigena koji izazivaju tumor-specifične imune odgovore. Mutaciono stanje tumora mogu predstavljati TMB i MSI, koji su genomski potpisi, povezani sa prezentacijom neoantigena tumora.

TruSight Oncology Comprehensive je test sveobuhvatnog genomskog profilisanja (CGP) pomoću sekvenciranja sledeće generacije (NGS), koji široko procenjuje genomske varijante u velikom panelu gena povezanih sa karcinomom, navedenih u [Tabela 2](#). Analiza detektuje male varijante u 517 gena, plus varijante amplifikacije, fuzije i spajanja gena, kao što je navedeno u [Tabela 2](#). Analiza obezbeđuje pokrivenost kodiranja sekvenci za sve gene osim za TERT, gde je pokriven samo region promotera i procenjuje TMB rezultat i MSI status. Ovi ciljevi analize uključuju sadržaj koji su citirale profesionalne organizacije kao što su Evropsko društvo za medicinsku onkologiju (ESMO) i druge glavne smernice SAD.² Nezavisne publikacije konzorcijuma i farmaceutska istraživanja u kasnoj fazi takođe su uticali na dizajn TSO Comprehensive analize.

Za listu regiona koji su isključeni iz pozivanja na varijante, pogledajte *TruSight Oncology Comprehensive blok-listu (dokument br. 200009524)*, dostupnu u Illumina centru za podršku. Blok-lista se naziva i crna lista u nekim datotekama.

U [Tabela 2](#) identifikovane su četiri kategorije tipa varijanti: Mala DNK varijanta (S), amplifikacija gena (A), fuzija (F) i varijanta spajanja (Sp). Male DNK varijante uključuju SNV, MNV, insercije i delecije.

Tabela 2 TSO Comprehensive (EU) Panel analize gena

Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCN	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PDK1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S

Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
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

Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante
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
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

Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
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

Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFHX3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	N/P	N/P	N/P	N/P
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	N/P	N/P	N/P	N/P
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	N/P	N/P	N/P	N/P
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	N/P	N/P	N/P	N/P

Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Tip varijante
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	N/P	N/P	N/P	N/P
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	N/P	N/P	N/P	N/P
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	N/P	N/P	N/P	N/P
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	N/P	N/P	N/P	N/P

Načela postupka

TSO Comprehensive (EU) analiza je distribuirana analiza koja se izvodi pomoću ekstrahovane nukleinske kiseline kao ulaznog materijala. DNK i/ili RNK ekstrahovane iz FFPE tkiva koriste se za pripremu biblioteka, koje su zatim obogaćene za gene-povezane sa karcinomom i sekvencirane na Instrument NextSeq 550Dx.

TSO Comprehensive (EU) analiza uključuje sledeće procese.

- **Priprema i obogaćivanje biblioteka**—Za RNK, ukupno 40 ng se konvertuje u dvolančanu komplementarnu DNK (cDNK). Za genomsku DNK (gDNK), 40 ng gDNK se smiče na male fragmente. Univerzalni adapteri za sekvenciranje su ligirani na cDNK i gDNK fragmentima. P5 i P7 indeksne sekvence su ugrađene u svaku biblioteku kako bi se omogućilo hvatanje fragmenata biblioteka na površini protočne ćelije tokom sekvenciranja. Indeksi uključuju jedinstvenu sekvencu za identifikaciju svakog pojedinačnog uzorka i, u slučaju biblioteka iz gDNK uzoraka, pojedinačnih molekula uz upotrebu jedinstvenih molekularnih identifikatora (UMI). Biblioteka se zatim obogaćuje za specifične gene od interesovanja pomoću metode zasnovane na hvatanju. Sekvence biotinizovane sonde koje obuhvataju regione gena od interesovanja koji su ciljani analizom hibridizovane su u biblioteka. Sonde i hibridizovane ciljane biblioteka izolovane su od neciljanih biblioteka hvatanjem streptavidinskim magnetnim česticama. Ciljane obogaćene biblioteka se peru i amplifikuju. Količina svake obogaćene biblioteka se zatim normalizuje pomoću metode zasnovane na zrnu kako bi se osigurala jednaka zastupljenost u objedinjenim bibliotekama za sekvenciranje.
- **Sekvenciranje i primarne analize**—Normalizovane, obogaćene biblioteka se objedinjuju i grupišu u protočnoj ćeliji, a zatim sekvenciraju pomoću sekvenciranja hemijskom sintezom (SBS) na NextSeq 550Dx. SBS hemijski postupak koristi metodu reverzibilnog završetka za otkrivanje pojedinačnih, fluorescentno obeleženih dezoksinukleotidnih trifosfatnih (dNTP) baza dok se one inkorporišu u rastuće DNK lance. Tokom svakog ciklusa sekvenciranja, jedna dNTP se dodaje lancu nukleinske kiseline. dNTP oznaka služi kao završetak za polimerizaciju. Nakon svake dNTP inkorporacije, fluorescentna boja se snima da bi se identifikovala baza, a zatim se odvaja da bi se omogućila inkorporacija sledećeg nukleotida. Četiri reverzibilne završno vezane dNTP (A, G, T i C) su prisutne kao pojedinačni, odvojeni molekuli. Kao rezultat toga, prirodna konkurencija minimizira pristrasnost konkurencije. Tokom primarne analize, pozivanja baza vrše se direktno iz merenja intenziteta signala tokom svakog ciklusa sekvenciranja, što dovodi do sekvenciranja od baze do baze. Ocena kvaliteta je dodeljena svakom pozivanju baze.
- **Sekundarna analiza**—Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) se nalazi na instrumentu NextSeq 550Dx kao deo Local Run Manager (LRM) softvera da bi se olakšalo podešavanje ciklusa TSO Comprehensive (EU) i izvršila sekundarna analiza rezultata sekvenciranja. Sekundarna analiza uključuje validaciju obrade ciklusa i kontrolu kvaliteta, nakon čega sledi demultipleksiranje, FASTQ generisanje datoteka, poravnanje i pozivanje varijante. Demultipleksiranje razdvaja podatke iz objedinjenih biblioteka na osnovu jedinstvenih indeksa sekvenci koji su dodati tokom postupka pripreme biblioteka. Generišu se FASTQ međudatoteke koje sadrže očitavanja sekvenciranja za svaki uzorak i ocene kvaliteta, isključujući očitavanja iz bilo kojih klastera koji nisu prošli filter. Očitavanja sekvenciranja su zatim poravnata sa referentnim genomom da bi se identifikovao odnos između sekvenci i dodeljen im je rezultat zasnovan na regionima sličnosti. Usklađena očitavanja se pišu u datoteke u BAM

formatu. Softver za analizu koristi odvojene algoritme za biblioteke generisane iz DNK i/ili RNK uzoraka, kako bi se pozvale male DNK varijante, amplifikacije gena, TMB i MSI za DNK uzorke i fuzije i varijante spajanja za RNK uzorke. Više izlaza generiše softverski modul za analizu, uključujući pokazatelje sekvenciranja i datoteke formata pozivanja varijanti (VCF). VCF datoteke sadrže informacije o varijantama pronađenim na određenim pozicijama u referentnom genomu. Pokazatelji sekvenciranja i pojedinačne izlazne datoteke generišu se za svaki uzorak. Pogledajte Vodič za tok rada modula za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (br. dokumenta 200008661) za detalje o sekundarnoj i tercijarnoj analizi.

- **Tercijarna analiza**—Tercijarna analiza, koju obavlja Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU), sastoji se od TMB i MSI proračuna, pratećeg dijagnostičkog pozivanja, profilisanja varijanti tumora na dva nivoa kliničkog značaja, koristeći bazu znanja (KB) i tip tkiva i generaciju izveštaja o rezultatima. Profilisanje tumora se takođe može nazvati sveobuhvatnim genomskim profilisanjem. Tumačenja rezultata varijante, kao i TMB i MSI rezultati biomarkera, sumirani su u TSO Comprehensive (EU) izveštaju o rezultatima.

Ograničenja postupka

Samo za *in vitro* dijagnostičku upotrebu.

- Samo na recept. Test se mora koristiti u skladu sa kliničkim laboratorijskim propisima.
- Genomski nalazi navedeni u [Tabela 2](#) predviđene namene nisu propisani ili konačni za označenu upotrebu bilo kog specifičnog terapijskog proizvoda.
- Za varijante navedene u TSO Comprehensive (EU) izveštaju o rezultatima u okviru Genomskih nalaza sa dokazima o kliničkom značaju i Genomskih nalaza sa potencijalnim kliničkim značajem, klinička validacija nije izvršena.
- Odluke o nezi pacijenata i lečenju moraju se zasnivati na nezavisnoj medicinskoj proceni nadležnog lekara, uzimajući u obzir sve primenljive informacije u vezi sa stanjem pacijenta, kao što su istorija pacijenta i porodice, fizikalni pregledi, informacije iz drugih dijagnostičkih testova i želje pacijenta, u skladu sa standardom negom u datoj zajednici.
- Kvalitet FFPE uzorka je veoma promenljiv. Uzorci koji nisu prošli standardne postupke fiksiranja možda neće generisati ekstrahovane nukleinske kiseline koje ispunjavaju zahteve za kontrolu kvaliteta analize ([Kontrola kvaliteta na stranici 81](#)). FFPE blokovi koji su uskladišteni duže od pet godina pokazali su nižu validnost.
- Performanse TSO Comprehensive (EU) u uzorcima dobijenih od pacijenata koji su imali transplantaciju organa ili tkiva nisu procenjene.
- U visoko preuređenim genomima sa delecijama i gubitkom heterozigotnosti, TSO Comprehensive (EU) softver može pogrešno klasifikovati DNK uzorak kao kontaminiran (CONTAMINATION_SCORE > 3106 i p-vrednost > 0,049).
- Negativni rezultat ne isključuje prisustvo mutacije ispod granica detekcije (LoD) analiza.
- Na osetljivost za detekciju malih DNK varijanti može da utiče:

- Genomski kontekst niske složenosti
- Povećanje dužine varijanti
- TMB rezultati mogu biti netačni u sledećim kontekstima:
 - Kako sadržaj tumora dostiže nivoe gde se konvergiraju učestalost zametnih i somatskih varijanti alela (VAF).
 - U populacijama koje nisu dobro zastupljene u javnim bazama podataka.
- Na osetljivost za detekciju fuzija može da utiče:
 - Niska složenost biblioteke što daje smanjena prateća očitavanja usled odstupanja u toku rada testa (na primer, pratite korake mešanja u [Denaturišite i zagrejte RNK na stranici 44](#)).
 - Kada jedan gen obuhvata obe tačke prekida.
 - U slučajevima kada je nekoliko tačaka prekida fuzije u neposrednoj blizini sa jednim ili više partnera; višestruke tačke prekida i partneri mogu biti prijavljeni kao jedna tačka prekida i partner.
 - Za male srednje veličine unosa; potrebna je minimalna srednja veličina unosa od 80 bp, ali se osetljivost smanjuje u opsegu od 80 do 100 bp.
 - Niska složenost sekvence ili homologni genomski kontekst oko tački prekida fuzije.
- Rezolucija gena uključenih u fuziju može da bude pogođena kada dođe do tački prekida fuzije u genomskim regionima koji sadrže preklapajuće gene. Analiza će prijaviti sve gene, ograničene tačkom i zarezom, ako više gena preklapa tačku prekida.
- Nedosledna pokrivenost u TERT regionu promotera može da dovede do „Nema rezultata” zbog niske dubine.
- Greške u beleškama ili KB mogu izazvati lažno pozitivan ili lažno negativan rezultat, uključujući navođenje varijante na pogrešnom nivou (između Genomskih nalaza sa dokazima o kliničkom značaju i genomskih nalaza sa potencijalnim kliničkim značajem), ili informacije o beleškama u izveštaju mogu biti netačne. Mogućnost greške postoji iz tri izvora:
 - TSO Comprehensive (EU) beleška varijante. Postoji stopa greške od oko 0,0027%, na osnovu analize od 2.448.350 varijanti COSMIC v92, stoga postoji niska mogućnost greške.
 - KB greška zbog procesa kuriranja ili razvrstavanja.
 - Značaj sadržaja KB se menja tokom vremena. Izveštaj će odražavati znanje u vreme kada je KB verzija kurirana.
 - Na varijante prijavljene u CDx rezultatima ne utiču greške u beleškama ili KB.
- TSO Comprehensive (EU) je dizajniran da prijavi somatske varijante prilikom izveštavanja o varijantama sa dokazima o kliničkom značaju ili varijantama sa potencijalnim kliničkim značajem. Kao test samo za tumor, izveštavanje o zametnoj varijanti (nasleđeno) je moguće, ali nenamerno. TSO Comprehensive (EU) koristi KB za izveštavanje o varijanti bez eksplicitne napomene da li su zametnog ili somatskog porekla.
- KB uključuje samo terapeutske, dijagnostičke i prognostičke povezanosti koje su relevantne za varijante prisutne u utvrđenoj solidnoj malignoj neoplazmi. Povezanost osetljivosti ili rizika od karcinoma nije uključena u KB.

Komponente proizvoda

TruSight Oncology Comprehensive (EU) Test se sastoji od sledećih komponentata:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) komplet (Illumina kataloški br. 20063092): Komplet sadrži reagens sa dovoljnom zapreminom za generisanje 24 DNK i 24 RNK biblioteka sa kontrolama, koje uključuju uzorke i kontrole pacijenta. Kontrole se prodaju odvojeno (pogledajte [Obavezni reagensi, nisu priloženi na stranici 18](#)).
- Baza znanja: Redovno se ažurira i dostupna je za preuzimanje na Illumina Lighthouse Portalu.
- Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illumina kataloški br. 20051843*), što obuhvata sledeće komponente i prateće profilisanje tumora i NTRK:
 - Paketi zahteva TSO Comprehensive (EU) v2.1.0 (br. dela 20079589)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 Software Suite (br. dela 20079588)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.6 USB komplet (br. dela 20079591)
- Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illumina kataloški br. 20051843*), što obuhvata sledeće komponente i prateće profilisanje tumora i NTRK:
 - Paketi zahteva TSO Comprehensive (EU) v2.0.0 (br. dela 20051760)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 Software Suite (br. dela 20075244)
 - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 USB komplet (br. dela 20075239)

* Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU): Illumina Predstavnik servisa instalira odgovarajuću verziju TSO Comprehensive (EU) modul analize na Local Run Manager Instrument NextSeq 550Dx. Pogledajte [Tabela 3](#) za verziju softvera Vodiča za tok rada i Modul analize.

Tabela 3 Vodič za tok rada za verziju softvera TSO modula sveobuhvatne analize

Vodič za tok rada	Tkivo	TSO Sveobuhvatna verzija softvera
200008661	FFPE	v2.3.5 ili v2.3.6

Reagensi

Priloženi reagensi

Uz TSO Comprehensive (EU) komplet obezbeđeni su sledeći reagensi.

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, br. dela 20031127

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli i nukleotide	Od -25°C do -15°C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli, DNK polimerazu, RNK-azu H i nukleotide	Od -25°C do -15°C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli i nasumične heksamere	Od -25°C do -15°C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži reverznu transkriptazu	Od -25°C do -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznuto), br. dela 20031118

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži T4 DNK polimerazu i polinukleotidnu kinazu	Od -25°C do -15°C

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli i nukleotide	Od -25°C do -15°C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli	Od -25°C do -15°C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži ligazu	Od -25°C do -15°C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži oligonukleotide univerzalnog sekvenciranja	Od -25°C do -15°C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži oligonukleotide univerzalnog sekvenciranja	Od -25°C do -15°C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli	Od -25°C do -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži DNK polimerazu i nukleotide	Od -25°C do -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno), br. dela 20031119

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli	Od 2°C do 8°C

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodeni rastvor koji sadrži magnetna zrna	Od 2°C do 8°C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 ml	Tris EDTA rastvor	Od 2°C do 8°C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers, br. dela 20031120

Aktivni sastojci: Puferovani vodeni rastvor koji sadrži pojedinačne oligonukleotidne prajmere sa bar-kodom.

Napomena Koristite jedinstvene indeksne prajmere (UPxx) zaRNK ili DNK uzorke.

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

TruSight Oncology Comp CP indeksni prajmeri, br. dela 20031126

Aktivni sastojci: Puferovani vodeni rastvor koji sadrži pojedinačne oligonukleotidne prajmere sa bar-kodom.



OPREZ

Koristite Kombinatorne indeksne prajmere (CPxx) samo za DNK uzorke (FFPE tok rada).

Indeksni prajmer	Broj dela	Količina	Zapremina	i7 indeks	Sekvenca	i5 indeks	Sekvenca	Temperatura skladištenja
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	Od -25°C do -15°C
CP02	20031462	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	Od -25°C do -15°C
CP03	20031463	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	Od -25°C do -15°C
CP04	20031464	1	20 µl	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	Od -25°C do -15°C
CP05	20031465	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	Od -25°C do -15°C
CP06	20031466	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	Od -25°C do -15°C

Indeksni prajmer	Broj dela	Količina	Zapremina	i7 indeks	Sekvenca	i5 indeks	Sekvenca	Temperatura skladištenja
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCGCGCGC	D507	ACGTCCTG	Od -25°C do -15°C
CP08	20031468	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	Od -25°C do -15°C
CP09	20031469	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	Od -25°C do -15°C
CP10	20031470	1	20 µl	D711	TCGCGCGC	D508	GTCAGTAC	Od -25°C do -15°C
CP11	20031471	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	Od -25°C do -15°C
CP12	20031472	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	Od -25°C do -15°C
CP13	20031473	1	20 µl	D711	TCGCGCGC	D519	CCGTCGCC	Od -25°C do -15°C
CP14	20031474	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	Od -25°C do -15°C
CP15	20031475	1	20 µl	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	Od -25°C do -15°C
CP16	20031476	1	20 µl	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	Od -25°C do -15°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno), br. dela 20031123

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži formaldehid i soli	Od 2°C do 8°C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli i paramagnetna zrna čvrste faze kovalentno obložene streptavidinom	Od 2°C do 8°C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Rastvor natrijum-hidroksida	Od 2°C do 8°C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Puferovani vodeni rastvor	Od 2°C do 8°C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži paramagnetna zrna u čvrstoj fazi	Od 2°C do 8°C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli, 2-merkaptetanol i formamid	Od 2°C do 8°C

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli	Od 2°C do 8°C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli	Od 2°C do 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodeni rastvor koji sadrži magnetna zrna	Od 2°C do 8°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto), br. dela 20031121

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži oligonukleotide	Od -25°C do -15°C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli	Od -25°C do -15°C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži deterdžent	Od -25°C do -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži DNK polimerazu i nukleotide	Od -25°C do -15°C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži P5 i P7 prajmere	Od -25°C do -15°C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Puferovani vodeni rastvor koji sadrži soli, 2-merkaptetanol i formamid	Od -25°C do -15°C

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
PhiX Internal Control (PX3 ili PhiX)	20031492	1	10 µl	Puferovni vodeni rastvor koji sadrži PhiX genomsku DNK	Od -25°C do -15°C

TruSight Oncology Comp Content Set, br. dela 20031122

Reagens	Broj dela	Količina	Zapremina	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Objedinjena oligonukleotidna sonda	Od -25°C do -15°C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Objedinjena oligonukleotidna sonda	Od -25°C do -15°C

Obavezni reagensi, nisu priloženi

Reagensi pre amplifikacije

- DNA and RNA Extraction and Purification Reagents – pogledajte odeljak [Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26](#) za zahteve za reagens
- DNA and RNA Quantification Reagents – pogledajte odeljak [Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26](#) za zahteve za reagens
- TruSight Oncology DNA Control (Illumina kataloški br. 20065041)
- TruSight Oncology RNA Control (Illumina kataloški br. 20065042)
- Ethanol 100% (čistoće 200), gradusa za molekularnu biologiju
- RNase/DNase-free water

Reagensi nakon amplifikacije

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa), (Illumina kataloški br. 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 ciklusa)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklusa)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 ciklusa)
- Ethanol 100% (čistoće 200), gradusa za molekularnu biologiju
- RNase/DNase-free water

Skladištenje i rukovanje reagensima

- Sledeće kutije reagenasa se šalju zamrznute. Čuvati na temperaturi od -25°C do -15°C.

Kutija	Broj dela	Oblast laboratorije
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Pre amplifikacije
TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznuto)	20031118	Pre amplifikacije
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Pre amplifikacije
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Pre amplifikacije
TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto)	20031121	Nakon amplifikacije
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Nakon amplifikacije



OPREZ

Nemojte čuvati reagense u jedinici za skladištenje bez-zamrzavanja ili u odeljcima vrata frižidera.

- Sledeće kutije reagenasa se šalju na pakovanjima sa gelom da bi se održala temperatura od 0°C do 10°C. Čuvati na 2°C do 8°C.

Kutija	Broj dela	Oblast laboratorije
TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno)	20031119	Pre amplifikacije
TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno)	20031123	Nakon amplifikacije



OPREZ

Nemojte zamrzavati reagense koji sadrže zrna (LNB1, SPB i SMB).

- Promene fizičkog izgleda reagensa mogu upućivati na propadanje materijala. Ako dođe do primena u fizičkom izgledu (na primer, promene boje reagensa ili zamućenosti), nemojte koristiti reagense.
- Stabilnost TSO Comprehensive (EU) analize je procenjena i pokazane su performanse za najviše četiri upotrebe kompleta. Reagensi su stabilni kada se skladište na naznačenim temperaturama do navedenog datuma isteka roka trajanja, navedenog na oznaci na kutiji.

Oprema i materijali

Obavezna oprema i materijali, nije priloženo

Oprema i materijali pre amplifikacije

Oprema	Dobavljač
Ultrazvučni uređaj sa pripadajućom dodatnom opremom Pogledajte odeljak Optimizacija ultrazvučnih uređaja za DNK fragmente na stranici 24.	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Ciklični termostat sledećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> Zagrejani poklopac sposoban da bude podešen na 30°C i 100°C (ili isključen ako nije sposoban na 30°C) Obuhvata temperaturni opseg od 4°C do 99°C Temperaturna tačnost ±0,25°C Kompatibilan sa PCR pločama sa 96 bunarčića, 0,2 ml (polipropilen) Pogledajte odeljak Stopa platforme cikličnog termostata na stranici 25 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vorteks mešalica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Inkubator za mikrouzorke (2) sa umetkom za MIDI ploče sa 96 bunarčića (2)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Mikrocentrifuga	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Centrifuga (ploča centrifuge) sa sledećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> Centrifugiranje mikroploča sa 96 bunarčića Kapacitet 280 × g 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Šejker-ploča sa sledećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> Orbita od 2 mm Može tresti na 1200 o/min i 1800 o/min 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Zaptivni klin ili valjak	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Magnetno postolje sa sledećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> Dizajniran za precipitaciju/separaciju paramagnetnih zrna Magneti na strani postolja, ne na dnu Za MIDI ploče sa 96 bunarčića 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Oprema	Dobavljač
Precizne pipete <ul style="list-style-type: none"> Pipete od 20 µl sa jednim ili više kanala Pipete od 200 µl sa jednim ili više kanala Pipete od 1000 µl sa jednim ili više kanala Koje ispunjavaju sledeće zahteve: <ul style="list-style-type: none"> Redovno se kalibriše, u okviru tačnosti od 5% 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Držać za pipete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 10 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Lepljive zaptivke za ploče sa 96 bunarčića sa sledećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> Poliester koji može da se ljušti, optički providan Pogodno za skrivene ili poluskrivene PCR ploče Jak lepak koji može da izdrži višestruke temperaturne promene od -40°C do 110°C Bez DNK-aze/RNK-aze 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Epruvete mikrocentrifuge od 1,7 ml, bez nukleaze	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Rezervoari reagenasa bez nukleaze (PVC, korito za jednokratnu upotrebu, 50 ml) (ili ekvivalent)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Konusne epruvete od 15 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Konusne epruvete od 50 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipete otporni na aerosoli od 20 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipete otporni na aerosoli od 200 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipete otporni na aerosoli od 1000 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Ploče za skladištenje sa 96 bunarčića, 0,8 ml (MIDI ploče)	Fisher Scientific, br. dela AB-0859 ili ekvivalent
PCR ploče sa 96 bunarčića, 0,2 ml (polipropilen)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Oprema i materijali nakon amplifikacije

Oprema	Dobavljač
NextSeq 550Dx Instrument	illumina, katalogski br. 20005715
Centrifuga (ploča centrifuge) sa sledećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> Centrifugiranje mikroploča sa 96 bunarčića Kapacitet 280 × g 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Ciklični termostat sledećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> Zagrejani poklopac (100°C) Obuhvata temperaturni opseg od 4°C do 99°C Temperaturna tačnost ±0,25°C Kompatibilan sa PCR pločama sa 96 bunarčića, 0,2 ml (polipropilen) Pogledajte odeljak Stopa platforme cikličnog termostata na stranici 25 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vorteks mešalica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Inkubator za mikrouzorke sa umetkom za MIDI ploče sa 96 bunarčića	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Suvi toplotni blok sa sledećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> Temperaturni opseg od 25°C do 99°C Temperaturna tačnost ±5°C Proverite da li su epruvete mikrocentrifuge kompatibilne sa toplotnim blokom 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Šejker-ploča sa sledećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> Orbita od 2 mm Može tresti na 1200 o/min i 1800 o/min 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Mikrocentrifuga	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Zaptivni klin ili valjak	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Magnetno postolje sa sledećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> Dizajniran za precipitaciju/separaciju paramagnetnih zrna Magneti na strani postolja, ne na dnu Za MIDI ploče sa 96 bunarčića 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Oprema	Dobavljač
Precizne pipete <ul style="list-style-type: none"> Pipete od 20 µl sa jednim ili više kanala Pipete od 200 µl sa jednim ili više kanala Pipete od 1000 µl sa jednim ili više kanala Koje ispunjavaju sledeće zahteve: <ul style="list-style-type: none"> Redovno se kalibriše, u okviru tačnosti od 5% 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Držać za pipete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 10 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Lepljive zaptivke za ploče sa 96 bunarčića sa sledećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> Poliester koji može da se ljušti, optički providan Pogodno za skrivene ili poluskrivene PCR ploče Jak lepak koji može da izdrži višestruke temperaturne promene od -40°C do 110°C Bez DNK-aze/RNK-aze 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Epruvete mikrocentrifuge, bez nukleaze	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Rezervoari reagenasa bez nukleaze (PVC, korito za jednokratnu upotrebu, 50 ml) (ili ekvivalent)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Konusne epruvete od 15 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Konusne epruvete od 50 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipete otporni na aerosoli od 20 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipete otporni na aerosoli od 200 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipete otporni na aerosoli od 1000 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Ploče za skladištenje sa 96 bunarčića, 0,8 ml (MIDI ploče)	Fisher Scientific, br. dela AB-0859 ili ekvivalent
PCR ploče sa 96 bunarčića, 0,2 ml (polipropilen)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Optimizacija ultrazvučnih uređaja za DNK fragmente

DNK fragmentacija ili smicanje utiče na performanse analize određivanjem distribucije veličine fragmenta, što zauzvrat utiče na pokrivenost sekvenciranja. Nekoliko konfiguracija fokusiranih ultrazvučnim uređajem procenjeno je i optimizovano za TSO Comprehensive (EU) analizu (Tabela 4). Vreme smicanja je prilagođeno da bi se maksimalno povećao pokazatelj MEDIAN_EXON_COVERAGE naveden u [Kontrola kvaliteta na stranici 81](#). Vreme smicanja (podebljano u Tabela 4) razlikovalo se u različitim konfiguracijama kao i rezultati MEDIAN_INSERT_SIZE. Sve tri konfiguracije testirane su pomoću epruveta sa 8 traka; korišćene zapremine prikazane su u Tabela 4.

Optimizacija konfiguracije 3 (pretvarač tačaka, nedegasirana voda, mala zapremina vodenog kupatila) koristila je pulsiranje i imala je najkraće vreme smicanja što je rezultiralo nešto većom distribucijom veličine fragmenta u poređenju sa druge dve konfiguracije (MEDIAN_INSERT_SIZE bila je približno 5-10 baznih parova veća). Pored toga, konfiguracija 3 je zahtevala povećani unos DNK (50 ng) da bi se postigao slična MEDIAN_EXON_COVERAGE u odnosu na druge dve konfiguracije, koje su koristile nominalni unos od 40 ng. Konfiguracija 3 ima više oštećenja i/ili denaturacije i stoga smanjenu efektivnu masu upotrebljivih dsDNK molekula za pripremu biblioteke.

Centrifugirajte epruvete za smicanje tokom procesa oporavka kako biste osigurali da se određena zapremina vraća jer bilo koji gubitak materijala može nepovoljno uticati na performanse.

Tabela 4 Procenjene konfiguracije fokusirane ultrazvučnim uređajem

Parametar	Konfiguracija		
	1	2	3
Pretvarač	Linija	Tačka	Tačka
Zapremina vodenog kupatila	5 l	5 l	85 ml
Voda degasirana	Da	Da	Ne
Hladnjak vode	Da	Da	Da
Temperatura vodenog kupatila	7°C	7°C	12°C
Maksimalna snaga incidenta (PIP)	450 W	175 W	50 W
% faktora opterećenja	30	10	30
Ciklusi po rafalu	200	200	1000
Pulsiranje (10 sek rafali)	Ne	Ne	Da
Vreme smicanja	250 s	280 s	200 s*
Obrada uzorka	1 – 8	1	1
Veličina serije	1 – 96	1 – 96	1 – 8
Veličina uzorka staklene epruvete sa 8 traka	130 µl	130 µl	50 µl
DNK ekvivalent unosa (za srednju pokrivenost egzona)	40 ng	40 ng	50 ng

* Vreme smicanja od 200 sekundi sastoji se od 10 sekundi rafala sa 20 ponavljanja.

Stopa platforme cikličnog termostata

Stopa platforme cikličnog termostata utiče na pokazatelje kontrole kvaliteta analize—upotrebljive MSI lokacije, srednji ciljni broj CNV binova, srednja veličina umetanja (RNK)—kao i na prateća očitavanja za varijante spajanja i fuzija. Preporučuje se optimizacija stope platforme cikličnog termostata. Na primer, testirani model je prilagođen sa podrazumevane (i maksimalne) brzine platforme od 5 stepeni C/s do 3 stepena C/s, kako bi se dobili uporedivi rezultati sa drugim modelima sa nižim podrazumevanim stopama platforme.

Prikupljanje, transport i skladištenje uzoraka

Pridržavajte se standardnog postupka prilikom prikupljanja, transporta, skladištenja i obrade uzoraka.

Zahtevi za uzorke

FFPE tkivo

TSO Comprehensive (EU) analiza zahteva 40 ng RNK i/ili 40 ng DNK ekstrahovane iz FFPE tkiva. Korišćenje i RNK i DNK omogućava analizu svih zahtevanih tipova varijanti. Tkivo treba da bude fiksirano pomoću formalina za fiksaciju koji je pogodan za molekularne analize (na primer, 10% formalin sa neutralnim puferom). Tkivo se ne može dekalcifikovati. Pre obavljanja TSO Comprehensive (EU) analize, patolog treba da pregleda uzorak tkiva da bi se uverio da je odgovarajući za ovaj test. Potrebno je najmanje 20% sadržaja tumora (po oblasti) za detekciju somatski pokrenutih mutacija. Potrebno je najmanje 30% sadržaja tumora za detekciju visokog MSI. Sadržaj tumora za amplifikaciju gena i RNK varijante zavisi od stepena obima amplifikacije ili ekspresije fuzije (pogledajte [Sadržaj tumora na stranici 100](#)).

Za veliku verovatnoću ekstrakcije 40 ng RNK i 40 ng DNK iz različitih tipova čvrstog tkiva, preporučena zapremina tkiva je $\geq 1,0 \text{ mm}^3$, što je ekvivalentno kumulativnoj vijabilnoj oblasti tkiva od $\geq 200 \text{ mm}^2$ koristeći isečke debljine $5 \mu\text{m}$ ili $\geq 100 \text{ mm}^2$ koristeći isečke debljine $10 \mu\text{m}$. Kumulativna oblast tkiva je zbir oblasti vijabilnog tkiva u svim isečcima dostavljenim za ekstrakciju. Na primer, kumulativna oblast tkiva od 200 mm^2 može se dobiti ekstrakcijom četiri isečka, svaki debljine $5 \mu\text{m}$ sa oblašću tkiva od 50 mm^2 ili pet isečaka, svaki debljine $10 \mu\text{m}$, sa oblašću tkiva od 20 mm^2 po isečku. Nekroza tkiva može da smanji količinu prinosa nukleinske kiseline. Da bi se smanjila mogućnost lažno negativnih rezultata, tkivo može biti makrodisecirano da bi se postigao željeni vijabilni sadržaj tumora.

Visoka količina nekrotičnog tkiva ($\geq 25\%$) može da ometa sposobnost TSO Comprehensive (EU) analize da detektuje amplifikacije gena i RNK fuzije.

Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline

- Ekstrahujte RNK i DNK iz FFPE uzoraka tkiva pomoću komercijalno dostupnih kompleta za ekstrakciju. Razlike u kompletima za ekstrakciju mogu da utiču na performanse. Pogledajte [Procena kompleta za ekstrakciju nukleinske kiseline na stranici 92](#).
- Čuvajte ekstrahovanu zalihi nukleinske kiseline u skladu sa uputstvima proizvođača kompleta za ekstrakciju.
- Da biste izbegli promene koncentracije tokom vremena, izmerite DNK i RNK neposredno pre početka pripreme biblioteke. Kvantifikujte RNK i DNK koristeći metodu fluorometrijske kvantifikacije koja koristi boje za vezivanje nukleinske kiseline. Koncentracija nukleinske kiseline treba da bude srednja vrednost najmanje tri merenja.

- Analiza zahteva 40 ng svakog RNK uzorka pripremljenog u RNK-azi/DNK-azi-bez vode (nije obezbeđeno), sa konačnom zapreminom od 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Analiza zahteva 40 ng svakog gDNK uzorka sa minimalnom koncentracijom ekstrakcije od 3,33 ng/µl. Za smicanje je potrebna konačna zapremina od 52 µl (0,77 ng/µl) sa najmanje 40 µl TEB (obezbeđeno) koji se koristi kao razblaživač.

Skladištenje biblioteke

Skladištite biblioteke u PCR ploče sa niskim vezivanjem 7 do 30 dana, u zavisnosti od tipa biblioteke (pogledajte [Tabela 5](#)).

Tabela 5 Vreme skladištenja biblioteke

Tip biblioteke	Ploča	Broj dana	Temperatura skladištenja
cDNK	PCF PCR	≤ 7	Od -25°C do -15°C
Fragmentisana gDNK	LP PCR	≤ 7	Od -25°C do -15°C
Prethodno obogaćivanje	ALS PCR	≤ 30	Od -25°C do -15°C
Post-obogaćivanje	ELU2 PCR	≤ 7	Od -25°C do -15°C
PCR nakon obogaćivanja	PL PCR	≤ 30	Od -25°C do -15°C
Normalizovano	NL PCR	≤ 30	Od -25°C do -15°C

Upozorenja i mere predostrožnosti

Bezbednost

1. **Neke komponente ove analize sadrže potencijalno opasne hemikalije. Udisanje, gutanje, kontakt sa kožom i očima mogu dovesti do telesnih povreda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijski mantil odgovarajuće za opasnost od izlaganja. Iskorišćenim reagensima treba rukovati kao hemijskim otpadom i odložiti ih na otpad u skladu sa primenljivim regionalnim, nacionalnim i lokalnim zakonima i propisima. Za listove sa bezbednosnim podacima (SDS), posetite support.illumina.com/sds.html.**
2. Rukujte svim uzorcima kao da su zarazni.
3. Pridržavajte se rutinskih laboratorijskih mera predostrožnosti. Ne primenjujte pipetiranje ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u prostorima namenjenim za rad. Koristite rukavice za jednokratnu upotrebu i laboratorijske mantile kada rukujete uzorcima i reagensima za analizu. Ruke temeljno operite nakon rukovanja uzorcima i reagensima za analizu.

Laboratorija

1. Da biste sprečili kontaminaciju, organizujte laboratoriju sa jednosmernim tokom rada. Oblasti pre i posle amplifikacije moraju imati namenjenu opremu i materijal (na primer, pipete, vrhovi pipeta, vorteks mešalica i centrifuga). Da biste sprečili prenos proizvoda ili sonde za amplifikaciju, izbegavajte povratak u oblast pre amplifikacije nakon ulaska u oblast posle amplifikacije.
2. Obavite korake za indekiranje PCR i obogaćivanje u oblasti posle amplifikacije kako biste sprečili prenos proizvoda amplifikacije.
3. Postupci pripreme biblioteke zahtevaju okruženje bez RNK-aze/DNK-aze. Temeljno dekontaminirajte radna područja pomoću sredstva za čišćenje i inhibiciju RNK-aze/DNK-aze. Koristite plastiku koja je sertifikovana da ne sadrži DNK-azu, RNK-azu i ljudsku genomsku DNK.
4. Za postupke nakon amplifikacije, temeljno očistite radne površine i opremu pre i posle svakog postupka, pomoću sveže napravljenog 0,5% rastvora natrijum-hipohlorita (NaOCl). Ostavite rastvor da dođe u kontakt sa površinama tokom 10 minuta, a zatim temeljno očistite 70% etil- ili izopropil-alkoholom.
5. Koristite epruvete mikrocentrifuge, ploče, vrhove pipeta i rezervoare bez nukleaze.
6. Koristite kalibrisanu opremu tokom cele analize. Pobrinite se za to da kalibrišete opremu na brzine, temperature i zapremine, navedene u ovom protokolu.
7. Koristite precizne pipete da biste osigurali preciznu isporuku reagensa i uzorka. Kalibrišite redovno, u skladu sa specifikacijama proizvođača.
8. Koristite sledeće smernice kada koristite multikanalne pipete:
 - Pipetirajte najmanje $\geq 2 \mu\text{l}$.
 - Uverite se da su vrhovi barijere dobro postavljeni i odgovarajući za brend i model multikanalne pipete.

- Pričvrstite vrhove pokretom zavrtnja kako biste bili sigurni da su svi vrhovi podjednako dobro pričvršćeni.
 - Aspirirajte pod uglom od 90°, sa jednakim nivoima zapremine tečnosti na svim vrhovima.
 - Pomešajte sve komponente nakon isporuke, pipetiranjem reakcione smeše gore-dole.
 - Nakon doziranja, proverite da li se tečnost ispušta iz svakog vrha.
9. Pobrinite se za to da koristite opremu koja je navedena za analizu i da ste podesili programe prema uputstvu.
10. Navedene temperature za ciklični termostat i inkubator mikrouzoraka, ukazuju na temperaturu reakcije, a ne nužno na podešenu temperaturu opreme.

Analiza

1. Izbegavajte unakrsnu kontaminaciju.
 - Pratite odgovarajuće laboratorijske prakse prilikom rukovanja uzorcima i reagensima.
 - Koristite sveži potrošni laboratorijski materijal i sveže vrhove pipeta između uzoraka i između doziranja reagenasa.
 - Koristite vrhove otporne na aerosol da biste smanjili rizik od unakrsne kontaminacije.
 - Koristite jednosmerni tok rada kada prelazite sa oblasti za pre amplifikaciju na oblasti nakon amplifikacije.
 - Rukujte i otvorite samo jedan indeksni prajmer istovremeno. Vratite poklopac na svaku indeksnu epruvetu odmah nakon upotrebe. U kompletu su obezbeđeni dodatni poklopci.
 - Često menjajte rukavice i ako dođu u kontakt sa indeksnim prajmerima ili uzorcima.
 - Uklonite neiskorišćene epruvete sa indeksnim prajmerima iz radne oblasti.
 - Nemojte vraćati reagense u epruvete za zalihe nakon upotrebe sa trakom epruvete, koritom ili rezervoarom.
 - Pomešajte uzorke pipetom i centrifugirajte ploču kada je naznačeno.
 - Koristite šejker mikroploče. Nemojte mešati ploče u vorteks mešalici.
2. Ne menjajte komponente analize iz različitih serija kompleta reagenasa. Serije kompleta reagenasa su identifikovane na nalepnici kutije kompleta reagenasa i listu glavne serije.
3. Odgovarajuće laboratorijske prakse su obavezne da bi se sprečila kontaminacija reagenasa, instrumenata, uzoraka i biblioteka nukleazama i PCR proizvodima. Kontaminacija nukleazama i PCR proizvodima može dovesti do netačnih i nepouzdanih rezultata.
4. Za optimalne performanse analize i skladištenje potreban je odgovarajući tip ploče. Obavezno pratite uputstva za prenos ploče u [Uputstvo za upotrebu na stranici 39](#).
5. Nepridržavanje navedenih postupaka može dovesti do pogrešnih rezultata ili značajnog smanjenja kvaliteta biblioteke.

6. Ukoliko nije navedena tačka bezbednog zaustavljanja u [Uputstvo za upotrebu na stranici 39](#), odmah pređite na sledeći korak.
7. Čuvajte reagense ili komponente analize na navedenoj temperaturi u određenim oblastima pre-amplifikacije i nakon-amplifikacije.
8. Nemojte čuvati reagense u jedinici za skladištenje bez zamrzavanja ili u odeljcima vrata frižidera.
9. Nemojte zamrzavati reagense koji sadrže zrna (LNB1, SPB i SMB).
10. Nemojte koristiti reagense koji su nepravilno uskladišteni.
11. Nemojte odstupati od postupaka mešanja i rukovanja koji su navedeni za svaki reagens. Neadekvatno mešanje ili prekomerno mešanje reagenasa u vorteks mešalici, može da dovede do neuspešnih rezultata uzorka.
12. Pripremite sveže glavne smeše i bacite preostalu zapreminu nakon upotrebe.
13. Uvek pripremite svež 80% etanol sa RNK-azom/DNK-azom bez vode za korake pranja. Etanol može da apsorbuje vodu iz vazduha, što može uticati na rezultate. Bacite 80% etanol nakon upotrebe u skladu sa lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima.
14. Prebacite naznačenu zapreminu eluata. Prenošnje manje količine od navedene zapremine eluata tokom koraka elucije može uticati na rezultate.
15. Koristite sledeće smernice za ultrazvučne uređaje. Obavezno pratite uputstva proizvođača.
 - Polako ubacite gDNK u ultrazvučnu epruvetu da biste izbegli stvaranje mehurića. Prekomerni mehurići ili sloj vazduha u epruveti za smicanje mogu dovesti do nepotpune fragmentacije.
 - Polako sipajte u ultrazvučne epruvete i izbegavajte prskanje.
 - Da biste izbegli pomeranje tečnosti i gubitak uzorka, nemojte ubacivati vrh pipete na dno epruvete ultrazvučnog uređaja kada uklanjate fragmentiranu DNK.
16. Nemojte pipetirati manje od 2 µl unosa uzorka.
17. Nemojte koristiti korito za doziranje reagenasa za korake koji zahtevaju da se svakom bunarčiću uzorka doda manje od 10 µl materijala.
18. Koristite P20 pipetu kada prenosite fragmentirani gDNK uzorak iz ultrazvučnih epruveta na ploču za prip. biblioteke (LP).
19. Nemojte kombinovati UMI i SUA1 adaptore zajedno.
20. Koristite SUA1 adaptore sa RNK uzorcima.
21. Koristite UMI adaptore sa DNK uzorcima.
22. Dodelite različite indeksne prajmere svakom uzorku biblioteke da biste jedinstveno identifikovali svaku biblioteku kada je objedinjena za sekvenciranje na jednoj protočnoj ćeliji.
23. Nemojte kombinovati CPxx i UPxx indeksne prajmere zajedno u istoj biblioteci.
24. Nepodudaranja između uzoraka i indeksnih prajmera dovode do prijavljivanja netačnog rezultata usled gubitka pozitivne identifikacije uzorka. Unesite ID uzoraka i dodelite indekse u Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) pre početka pripreme biblioteke. Zabeležite ID uzoraka, indeksiranje i orijentaciju bunarčića ploče zbog reference tokom pripreme biblioteke.

25. Za biblioteke izvedene iz RNK uzoraka, koristite samo UPxx indekse.
26. Za biblioteke izvedene iz DNK uzoraka, koristite UPxx indekse ili CPxx indekse.
27. Sekvencirajte 8 RNK biblioteka i 8 DNK biblioteka po protočnoj ćeliji. Pogledajte [Broj biblioteka i izbor indeksa na stranici 36](#).
28. Sekvencirajte najmanje tri biblioteke. Pregledajte smernice u odeljku [Broj biblioteka i izbor indeksa na stranici 36](#).
29. Nakon koraka vezivanja u [Hvatanje jednog cilja na stranici 61](#) i [Hvatanje drugog cilja na stranici 65](#), odmah pređite na korak pranja da biste sprečili sušenje peleta zrna.
30. Tokom koraka pranja, proverite da li je 80% etanol uklonjen sa dna bunarčića. Rezidualni etanol može uticati na rezultate.
31. Za optimalne performanse analize, pratite navedeni broj pranja navedenih u [Uputstvo za upotrebu na stranici 39](#).
32. Tokom [Normalizovane biblioteke na stranici 71](#) postupka, temeljito resuspendujte pelet zrne biblioteke da biste postigli konzistentnu gustinu klastera na protočnoj ćeliji.

Napomene u vezi sa postupkom

- TSO Comprehensive (EU) Tok rada se može sprovesti prema sledećem rasporedu.
 - 1. dan: cDNK sinteza iz RNK uzoraka, DNK fragmentacija gDNK uzoraka, priprema biblioteke i početak (prve) hibridizacije preko noći.
 - 2. dan: Obogaćivanje, normalizacija obogaćenih biblioteka i učitavanje biblioteka na Instrument NextSeq 550Dx.

Ako nije moguće izvršiti TSO Comprehensive (EU) tok rada u skladu sa ovim rasporedom, nekoliko bezbednih tačaka zaustavljanja navedeno je u celom protokolu. Ukoliko u protokolu nije navedena tačka bezbednog zaustavljanja, odmah pređite na sledeći korak.

- Biblioteke izvedene iz RNK i DNK uzoraka mogu se istovremeno pripremati u odvojenim bunaričićima.
- Tabele pripreme glavne smeše obuhvataju prekomernu zapreminu da bi se obezbedilo da ima dovoljno zapremine za broj uzoraka koji se obrađuju.
- Koristite vodu molekularnog kvaliteta koja je bez nukleaza.
- Nakon dodavanja reagensa, isperite vrh aspiracijom i doziranjem jednom u odgovarajući bunarčić na ploči, osim ako nije drugačije naznačeno u postupku.
- Sobna temperatura se definiše kao temperatura od 15°C do 30°C.

Programi cikličnog termostata

- Programirajte programe cikličnog termostata na opremi za pre amplifikacije i nakon amplifikacije pre započinjanja protokola.
- Uverite se da se PCR ploče dobro uklapaju u ciklični termostat.
- Koristite ploče koje preporučuje proizvođač cikličnog termostata.

Zatvaranje i otvaranje ploča

- Uvek zapečatite ploče novom lepljivom zaptivkom ploče. Nemojte ponovo koristiti zaptivke.
- Da biste zapečatili ploču, bezbedno nanosite lepljivi poklopac na ploču pomoću zaptivnog klina ili valjka.
- Uvek zatvorite ploču sa 96 bunarčića pomoću lepljive zaptivke ploče pre prelaska na sledeće korake u protokolu.
 - Koraci za trešenje ploče
 - Koraci centrifugiranja
 - Koraci cikličnog termostata
 - Hibridizacije
 - Dugoročno skladištenje

- Uverite se da su ivice i bunarčići zapečaćeni da bi se smanjio rizik od unakrsne kontaminacije i isparavanja.
- Stavite ploču na ravnu površinu pre nego što polako skinete poklopac.
- Pre otvaranja, ako se primeti bilo kakva tečnost ili kondenzacija na zaptivaču ili bočnim zidovima bunarčića ploče, centrifugirajte na 280 × g tokom 1 minuta.
- Koristite lepljive zaptivke ploče koje su efikasne na temperaturi od -40°C do 110°C i pogodne su za skrivene ili poluskrivene PCR ploče.

Oprema

- Uverite se da je osoblje laboratorije upoznato sa uputstvima proizvođača za rad i održavanje celokupne opreme pre početka analize.

Tip ploče i prenos ploče

- Za optimalne performanse analize i skladištenje potreban je odgovarajući tip ploče.
- Prilikom prenosa zapremina između ploča prebacite navedenu zapreminu iz svakog bunarčića ploče u odgovarajući bunarčić odredišne ploče.
- Višekanalne pipete se mogu koristiti prilikom prebacivanja uzoraka između traka za epruvete ili ploča.
- Koristite sledeće smernice za trešenje ploča.
 - Koristite šejker da protresete ploče. Nemojte stavljati ploče u vorteks mešalicu.
 - Protresite PCR ploče na 1200 o/min.
 - Protresite MIDI ploče na 1800 o/min.
 - Pratite uputstva proizvođača da biste bili sigurni da šejker ploče bezbedno drži ploču.

Centrifugiranje

- Kada uputstva u protokolu ukazuju na kratko centrifugiranje, centrifugirajte na 280 × g tokom 1 minuta.
- Ako se tečnost uoči na zaptivaču ili na stranama bunarčića, centrifugirajte ploču na 280 × g tokom 1 minuta.

Rukovanje reagensima

- Čvrsto ponovo zatvorite sve epruvete sa reagensima odmah nakon upotrebe da biste ograničili isparavanje i sprečili kontaminaciju.
- Vratite reagense na naznačenu temperaturu skladištenja kada više nisu potrebni za postupak.
- Pratite pripremu reagensa koja prethodi svakom odeljku postupka [Uputstvo za upotrebu na stranici 39](#).
- Obavezno pripremite potrebnu zapreminu glavne smeše, smeše za eluciju i 80% etanol za broj uzoraka koje obrađujete.

- Tabele zapremina obezbeđenih u glavnoj smeši i rastvorima sa prekomernom zapreminom. Izračunavanja za prekomernu zapreminu su sledeća.
 - **Tabela 14**
 - Zapremina FSM = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{broj uzoraka} + \text{kontrola}) \times (1,25)$.
 - Zapremina RVT = $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{broj uzoraka} + \text{kontrola}) \times (1,25)$.
 - **Tabela 21**
 - Zapremina ERA1-B = $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,20)$.
 - Zapremina ERA1-A = $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,20)$.
 - **Tabela 29**
 - Zapremina EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,364)$.
 - Zapremina HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,364)$.
 - **Tabela 30**
 - Zapremina EE2 = $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,364)$.
 - Zapremina HP3 = $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,364)$.
 - **Tabela 36**
 - Zapremina LNA1 = $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (2,0)$.
 - Zapremina LNB1 = $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (2,0)$.
 - **Tabela 37**
 - Zapremina EE2 = $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,25)$.
 - Zapremina HP3 = $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,25)$.

Kompleti adaptera

- TSO Comprehensive (EU) analiza uključuje UMI adaptere i SUA1 adaptere.
- SUA1 adapteri su namenjeni za upotrebu sa RNK uzorcima, a ne za DNK.
- UMI adapteri su namenjeni za upotrebu sa DNK uzorcima, a ne za RNK.

Rukovanje zrnima

- Tri vrste zrna su uključene u TSO Comprehensive (EU) analizu (SPB, SMB i LNB1). Uverite se da se tokom postupka koristi odgovarajući tip zrna.
- Izvršite tačan broj pranja za svaki tip zrna.
- Uverite se da su zrna na sobnoj temperaturi pre upotrebe.
- Pomešajte zrna 1 minut pre upotrebe da biste osigurali homogenost.
- Koristite sledeće smernice kada mešate zrna pipetom.

- Koristite odgovarajuću pipetu i veličinu vrha za zapreminu koju mešate.
- Podesite zapreminu na približno 50–75% zapremine uzorka.
- Pipetirajte polako bez oslobađanja klipa.
- Izbegavajte prskanje i uvođenje mehurića.
- Postavite vrh pipete iznad peleta i sipajte direktno u pelet da biste oslobodili zrna iz bunarčića ili epruvete.
- Uverite se da je pelet zrna u potpunosti u rastvoru. Rastvor treba da ima tamno smeđu boju i da ima homogenu konzistenciju.
- Procenite da li je prisutan pelet zrna. Pažljivo aspirirajte ukupni rastvor zrna iz bunarčića u vrh i pogledajte dno bunarčića.
- Ako su zrna aspirirane u vrhove pipete tokom koraka magnetne separacije, vratite zrna u bunarčić ploče na magnetnom postolju. Sačekajte da se tečnost izbistri (približno 2 minuta) pre nego što pređete na sledeći korak postupka.
- Prilikom pranja zrna:
 - Koristite preporučeno magnetno postolje za ploču.
 - Sipajte tečnost direktno na pelet zrna tako da zrna sa strane bunarčića budu nakvašena.
 - Držite ploču na magnetnom postolju dok postupak ne odredi da je uklonite.
 - Ne ometajte ploču dok je na magnetnom postolju.
 - Dok je na magnetnom postolju, ne ometajte pelet zrna.
- Kada perete zrna ili uklanjate supernatant, postavite vrhove pipete pod uglom na dnu bunarčića da biste izbegli stvaranje vakuuma i povlačenje rastvora u filtere vrha pipete.

Obrazac za laboratorijsko praćenje

- *Obrazac za praćenje laboratorije TruSight Oncology Comprehensive (EU) (dokument br. 200009022) pruža kontrolnu listu za korake protokola.*

Broj biblioteka i izbor indeksa

Pre podešavanja ciklusa, planirajte broj biblioteka uzoraka i indeksa uzoraka za ciklus sekvenciranja. Sledeće smernice za broj uzorka uključuju pozitivne kontrole, ali isključuju negativne kontrole/kontrole bez predloška (NTC). NTC se mora dodati planiranom ciklusu kao dodatni uzorak.

Za TSO Comprehensive (EU), pratite smernice u [Tabela 6](#) i [Tabela 7](#) za određivanje broja biblioteka u sekvenci na jednoj ćeliji protoka.

Tabela 6 DNK ili RNK biblioteke za TSO Comprehensive (EU)

Tip biblioteke	Minimalno*	Maksimalno
RNK	3	16
DNK	3	8

Za optimalnu upotrebu reagenasa prilikom sekvenciranja TSO Comprehensive (EU) na Instrument NextSeq 550Dx, sekvenca 8 RNK biblioteka + 8 DNK biblioteka po ćeliji protoka.

Tabela 7 RNK i DNK biblioteke kombinovano za TSO Comprehensive (EU)

Broj DNK biblioteka	Broj RNK biblioteka
8	8

Tokom pripreme biblioteke, dodajte indeksni prajmer u svaku biblioteku uzoraka. *Koristite drugačiju smešu indeksnih prajmera za svaku biblioteku uzoraka.* Indeksni prajmeri jedinstveno identifikuju svaki uzorak tako da bi se biblioteke mogle grupisati zajedno za sekvenciranje na jednoj ćeliji protoka. (Kompatibilne kombinacije indeksa prikazuju se na ekranu Kreiraj ciklus tokom podešavanja ciklusa na Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU).)

Uverite se da se indeksni prajmeri koje koristite sa uzorcima podudaraju sa indeksima koje ste izabrali za analizu pomoću Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU). *Nepodudaranja dovode do prijavljivanja netačnog rezultata usled gubitka pozitivne identifikacije uzorka.*

Postoje dve vrste indeksa u TSO Comprehensive (EU) analizi.

- **UPxx indeksi**—Koristite UPxx indekse za biblioteke izvedene iz RNK ili DNK uzoraka.
- **CPxx indeksi**—Koristite CPxx indekse za biblioteke izvedene iz DNK uzoraka. Nemojte koristiti CPxx indekse za biblioteke izvedene iz RNK ili ako sekvencirate ukupno tri DNK biblioteke.

Prilikom sekvenciranja samo tri biblioteke, potrebno je sledeće.

- Biblioteke moraju biti sve DNK ili sve RNK.
- Nemojte koristiti CPxx skupove indeksa.
- Jedan od sledećih UPxx indeksnih skupova potreban je da bi se obezbedila dovoljna raznolikost.
 - UP01, UP02 i UP03

- UP04, UP05 i UP06
- UP07, UP08 i UP09
- UP10, UP11 i UP12

Na primer, prva biblioteka je dodeljena UP01, druga biblioteka UP02 i treća biblioteka UP03.

TruSight Oncology kontrole

TSO Comprehensive (EU) zahteva upotrebu TruSight Oncology kontrole, koji se sastoji od TruSight Oncology DNK kontrole i TruSight Oncology RNK kontrole kao pozitivnih kontrola. Uključite TruSight Oncology DNK kontrolu za svaki ciklus DNK sekvenciranja i TruSight Oncology RNK kontrolu za svaki ciklus RNK sekvenciranja u okviru datog događaja pripreme biblioteke (uključite i kontrole za kombinovane DNK i RNK cikluse). Jedinствена pozitivna kontrola je pripremljena za svaki planirani ciklus sekvenciranja.

Uključite jedan NTC u svaki događaj pripreme RNK i DNK biblioteke. NTC je više puta sekvenciran u okviru jednog događaja pripreme biblioteke. Pratite ove smernice za TruSight Oncology kontrole:

- Pripremite biblioteke iz pozitivnih kontrola i kontrola bez predloška identično uzorcima.
- Koristite TEB za DNK NTC.
- Koristite DNK-azu/RNK-azu bez vode za RNK NTC.
- Pozitivne kontrole su uključene u maksimalni zahtev biblioteke.
- NTC nisu uključeni u minimalni zahtev za biblioteku.
- Koristite UP indekse za NTC kada sekvencirate 3 biblioteke.
- Kako se NTC sekvencira više puta, indeksi izabrani za ovu kontrolu ne mogu se ponoviti u događaju pripreme biblioteke.

Tabele u nastavku prikazuju primere rasporeda ploča za pripremu biblioteke. Svaka numerisana kolona predstavlja jedan ciklus sekvenciranja. Prilikom zajedničkog sekvenciranja DNK i RNK biblioteka, svaki odgovarajući skup kolona predstavlja jedan ciklus sekvenciranja (na primer, kolona 1 i kolona 7). NTC je sekvenciran za svaku kolonu ili skup kolona.

Tabela 8 Događaj pripreme biblioteke za jedan ciklus uključujući šest uzoraka pacijenata

	1	2	3	4	5	6	7
A	Poz. DNK kontrola	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	Poz. RNK kontrola
B	DNK 1	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 1
C	DNK 2	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 2
D	DNK 3	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 3
E	DNK 4	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 4
F	DNK 5	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 5
G	DNK 6	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK 6
H	DNK NTC	prazno	prazno	prazno	prazno	prazno	RNK NTC

Tabela 9 Događaj pripreme biblioteke od tri ciklusa uključujući 20 uzoraka pacijenata

	1	2	3	4	5	6	7
A	Poz. DNK kontrola	Poz. DNK kontrola	Poz. DNK kontrola	prazno	Poz. RNK kontrola	Poz. RNK kontrola	Poz. RNK kontrola
B	DNK 1	DNK 7	DNK 14	prazno	RNK 1	RNK 7	RNK 14
C	DNK 2	DNK 8	DNK 15	prazno	RNK 2	RNK 8	RNK 15
D	DNK 3	DNK 9	DNK 16	prazno	RNK 3	RNK 9	RNK 16
E	DNK 4	DNK 10	DNK 17	prazno	RNK 4	RNK 10	RNK 17
F	DNK 5	DNK 11	DNK 18	prazno	RNK 5	RNK 11	RNK 18
G	DNK 6	DNK 12	DNK 19	prazno	RNK 6	RNK 12	RNK 19
H	DNK NTC	DNK 13	DNK 20	prazno	RNK NTC	RNK 13	RNK 20

Uputstvo za upotrebu

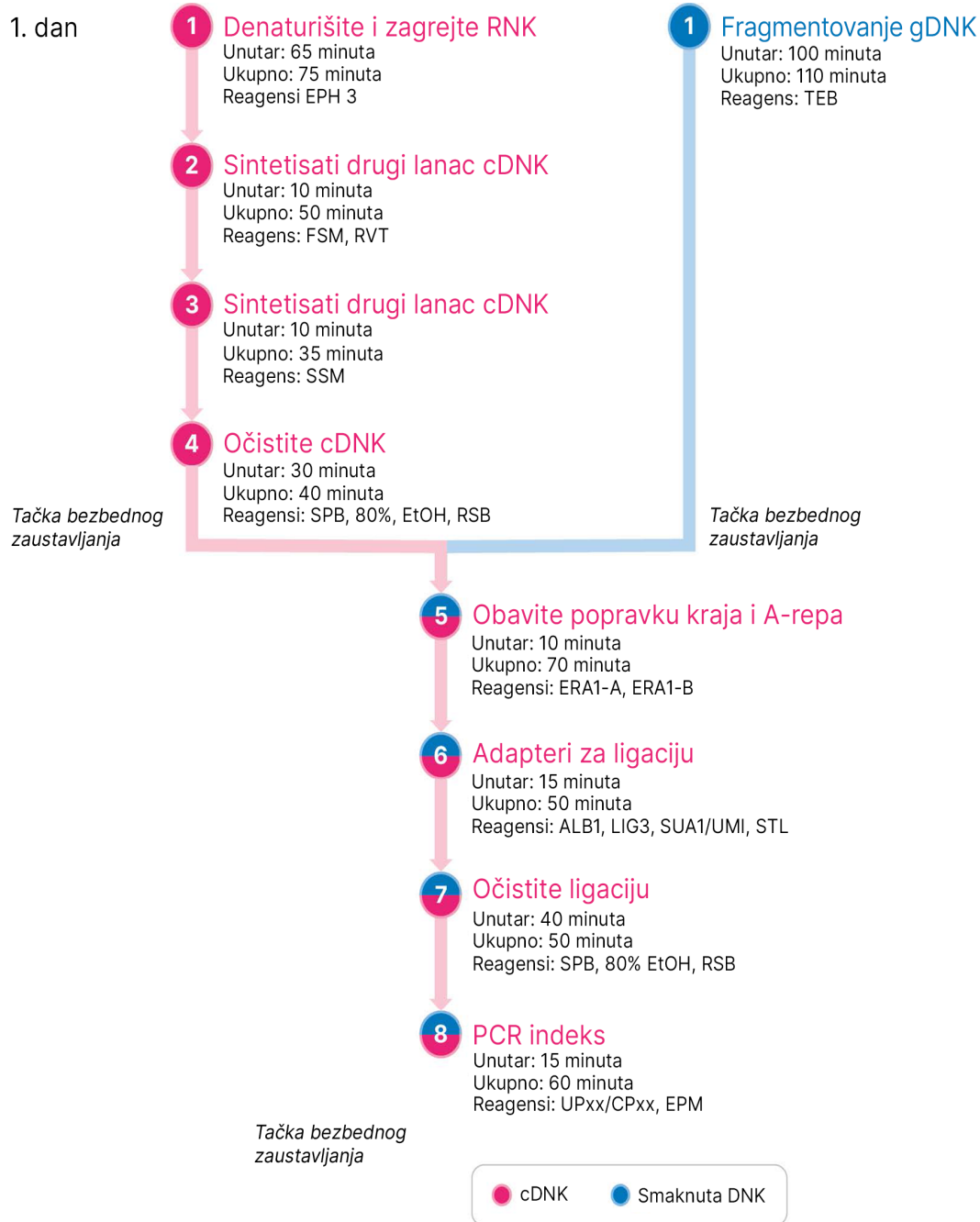
Pregled TSO Comprehensive (EU) toka rada prikazan je na [Slika 1](#) i [Slika 2](#).

Tok rada za pripremu biblioteke

[Slika 1](#) ilustruje tok rada za prip. biblioteke za TSO Comprehensive (EU). Biblioteke iz RNK i DNK uzoraka mogu se istovremeno pripremati u odvojenim bunarčićima. Pozitivne kontrole i kontrole bez predloška obrađuju se identično sa uzorcima. Tačke bezbednosnog zaustavljanja označene su između koraka.

Pre započinjanja protokola, unesite informacije o ciklusu i uzorku u list sa uzorkom v2 koji će se koristiti sa Modul za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU). Pogledajte Vodič za tok rada modula za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (br. dokumenta 200008661).

Slika 1 TSO Comprehensive (EU) Tok rada (deo 1)

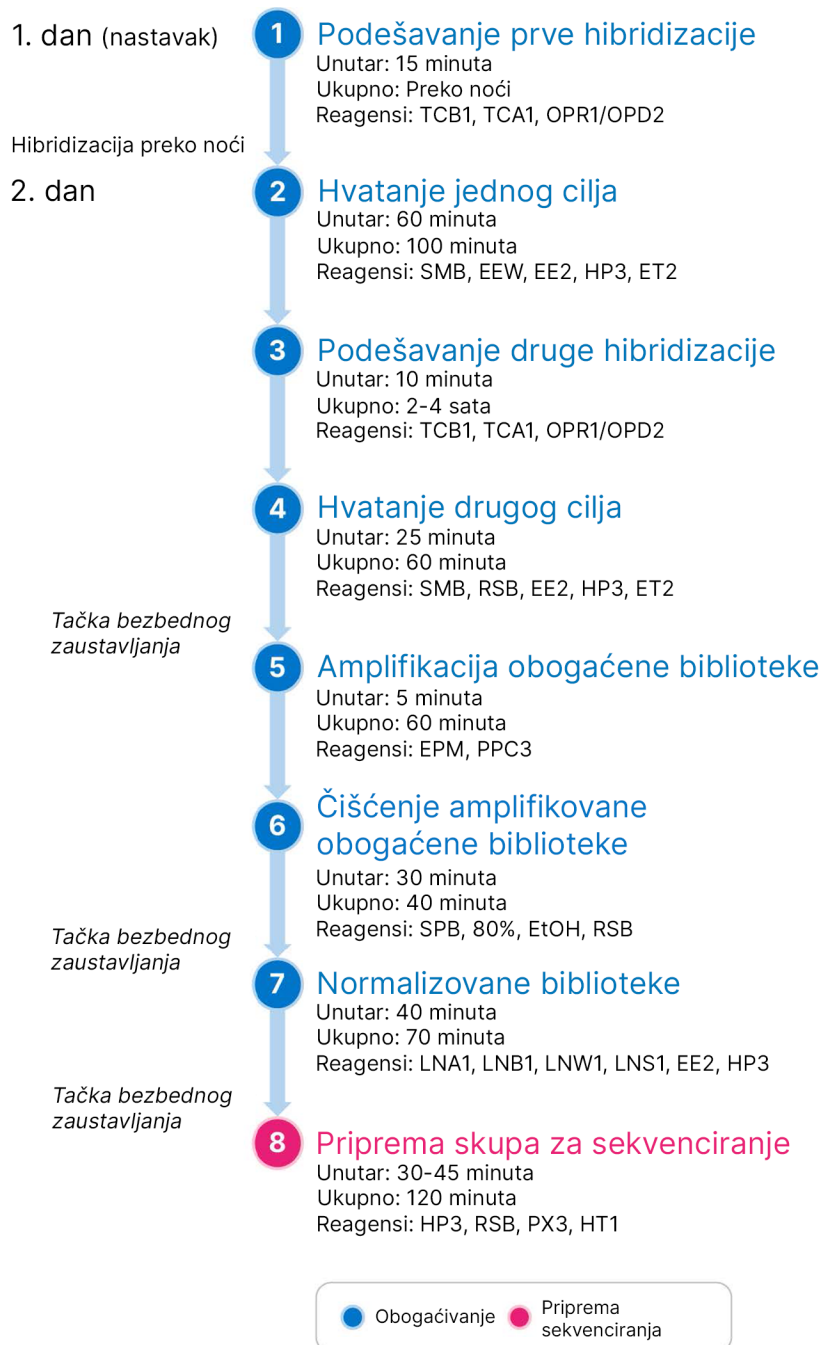


* Vreme unutar i ukupno vreme su približna.

Tok rada za obogaćivanje

Slika 2 ilustruje tok rada obogaćivanja za TSO Comprehensive (EU). Tačke bezbednosnog zaustavljanja označene su između koraka.

Slika 2 TSO Comprehensive (EU) Tok rada (2. deo)



Programi cikličnih termostata

Pre početka analize, sačuvajte sledeće programe na cikličnim termostatima pre i posle amplifikacije.

Tabela 10 Programi cikličnog termostata pre amplifikacije

Korak postupka	Naziv programa	Temperatura poklopca	Zapremina reakcije	Parametri cikličnog termostata
Denaturacija i zagrevanje RNK	LQ-RNK	100°C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 65°C tokom 5 minuta • 4°C tokom 1 minuta • 4°C držanje
Sintetisanje prvog cDNK lanca	1. SS	100°C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 25°C tokom 10 minuta • 42°C tokom 15 minuta • 70°C tokom 15 minuta • 4°C tokom 1 minuta • 4°C držanje
Sintetisanje drugog cDNK lanca	2. SS	30°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 16°C tokom 25 minuta • 4°C tokom 1 minuta • 4°C držanje

NAPOMENA Ako temperatura poklopca za 2. SS ne može da se podesi na 30°C, isključite opciju prethodnog zagrevanja poklopca.

Tabela 11 Programi cikličnog termostata nakon amplifikacije

Korak postupka	Naziv programa	Temperatura poklopca	Zapremina reakcije	Parametri cikličnog termostata
PCR indeks	I-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C tokom 30 sekundi • 15 ciklusa za: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C tokom 10 sekundi • 60°C tokom 30 sekundi • 72°C tokom 30 sekundi • 72°C tokom 5 minuta • 10°C držanje

Korak postupka	Naziv programa	Temperatura poklopca	Zapremina reakcije	Parametri cikličnog termostata
Obavite prvu hibridizaciju	HYB1	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C tokom 10 minuta • 85°C tokom 2 min. i 30 sekundi • 75°C tokom 2 min. i 30 sekundi • 65°C tokom 2 min. i 30 sekundi • 57°C držite 8 do 24 sata
Obavite drugu hibridizaciju	HYB2	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C tokom 10 minuta • 85°C tokom 2 min. i 30 sekundi • 75°C tokom 2 min. i 30 sekundi • 65°C tokom 2 min. i 30 sekundi • 57°C držite 1,5 do 4 sata
Amplifikacija obogaćene biblioteke	EL-PCR	100°C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C tokom 30 s • 18 ciklusa za: <ul style="list-style-type: none"> • 98°C tokom 10 s • 60°C tokom 30 s • 72°C tokom 30 s • 72°C tokom 5 min. • 10°C držanje

Priprema za korake protokola

1. Temeljno dekontaminirajte radna područja pomoću sredstva za čišćenje i inhibiciju RNK-aze/DNK-aze.



OPREZ

Svi postupci u toku rada zahtevaju okruženje bez RNK-aze/DNK-aze.

2. Podesite programe cikličnog termostata pre amplifikacije. Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42.](#)
3. Pratite uputstva proizvođača za podešavanje ultrazvučnog uređaja.
4. Ako obrađujete samo DNK uzorke, pređite direktno na [Fragmentovanje gDNK na stranici 49.](#)
5. Uklonite RNK kontrole iz skladišta.
6. Izvadite epruvete sa reagensima iz kutije i pratite uputstva za odmrzavanje.

Tabela 12 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, (br. dela 20031127)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
EPH3	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature	Denaturišite i zagrejte RNK
FSM	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature	Sintetišite prvi lanac cDNK
RVT	Od -25°C do -15°C	Držati na ledu	Sintetišite prvi lanac cDNK
SSM	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature	Sintetišite drugi lanac cDNK

Tabela 13 TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno), (br. dela 20031119)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
SPB (svetlozelena nalepnica)	Od 2°C do 8°C	Ostavite 30 minuta da dostigne sobnu temperaturu.	Očistite cDNK
RSB	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Očistite cDNK

Denaturišite i zagrejte RNK

Ovaj proces denaturiše prečišćenu RNK i prajmira sa nasumičnim heksamerima u pripremi za cDNK sintezu.

Priprema

- Pripremite sledeće reagense.
 - EPH3 – Odvojite sa strane.
 - FSM – Pomešajte u vorteks mešalici. Kratko centrifugirajte, a zatim pipetirajte radi mešanja. Reagens može da sadrži bele čestice povezane sa proizvodom. Nije potrebna nikakva radnja korisnika. Nema uticaja na performanse proizvoda.
 - RVT—Kratko centrifugirajte, a zatim pipetirajte radi mešanja. Držati na ledu.

NAPOMENA RVT je viskozni rastvor. Smanjite formiranje mehurića tokom pipetiranja.

- U epruveti mikrocentrifuge, kombinujte sledeće zapremine da biste pripremili FSM + RVT glavnu smešu.

Tabela 14 FSM + RVT glavna smeša

Komponenta glavne smeše	4 biblioteke (µl)	8 biblioteka (µl)	16 biblioteka (µl)	24 biblioteka (µl)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

Ova tabela uključuje prekomernu zapreminu. Za izračunavanja pogledajte odeljak [Rukovanje reagensima na stranici 33](#).

- Pipetirajte deset puta radi mešanja.

4. Postavite FSM + RVT glavnu smešu na led do [Sintetižite prvi lanac cDNK na stranici 45](#).

Postupak

1. Odmrznite ekstrahovane RNK uzorke i RNK kontrole na ledu.
Obraduje RNK kontrole kao uzorke za ostatak protokola.
2. Čuvajte RNK na ledu kada se ne koristi. Pogledajte [Zahtevi za uzorke na stranici 26](#) radi kvantifikacije uzoraka.
3. Pipetirajte svaki RNK uzorak 10 puta da biste ga pomešali.
4. Koristite RNK-azu/DNK-azu bez vode da biste pripremili 40 ng svakog RNK uzorka u konačnoj zapremini od 8,5 µl (4,7 ng/µl).
Za RNK kontrole, koristite koncentraciju koja se nalazi na nalepnici epruvete.
5. Označite novu PCR ploču CF sa 96 bunarčića (cDNA fragmenti).
6. Dodajte 8,5 µl svakog RNK uzorka u jedinstveni bunarčić CF PCR ploče.
7. Uverite se da se raspored ploče sa uzorcima i indeksi za svaki uzorak podudaraju sa ciklusom, planiranim u TSO Comprehensive (EU) modul analize tokom podešavanja ciklusa.
8. Pomešajte EPH3 u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
9. Dodajte 8,5 µl EPH3 u svaki bunarčić uzorka.
10. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CF PCR ploču.



OPREZ

Uverite se da ste potpuno zapečatili ivice i bunarčiće kako biste sprečili isparavanje.

11. Protresite na 1200 o/min tokom 1 minuta.
12. Centrifugirajte na 280 × g 1 minut.
13. Postavite na ciklični termostat i pokrenite LQ-RNK program.
Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42](#).
14. Kada uzorci dostignu 4°C, držite jedan minut, a zatim odmah pređite na sledeći korak.

Sintetižite prvi lanac cDNK

Ovaj proces reverzno transkriptuje RNK fragmente prajmovane nasumičnim heksamerima u prvi cDNK lanac pomoću reverzne transkriptaze.

Postupak

1. Uklonite CF PCR ploču iz cikličnog termostata.
2. Pipetirajte 10 puta da biste pomešali FSM + RVT glavnu smešu. Uverite se da je FSM + RVT smeša potpuno homogena.
3. Dodajte 8 µl FSM + RVT glavnu smešu u svaki bunarčić uzorka.

- Pipetirajte 10 puta radi mešanja.
- Bacite preostalu FSM + RVT glavnu smešu.
- Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CF PCR ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
- Protresite na 1200 o/min tokom 1 minuta.
- Centrifugirajte na 280 × g 1 minut.
- Postavite na ciklični termostat i pokrenite 1. SS program.
Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42.](#)
- Kada uzorci dostignu 4°C, odmah pređite na sledeći korak.
Prvi uzorci lanca mogu se čuvati na 4°C do 5 minuta.

Sintetižite drugi lanac cDNK

Ovaj proces uklanja RNK predložak i sintetiše dvolančanu cDNK.

Priprema

- Pripremite sledeći reagens.
 - SSM – Okrenite 10 puta gore-dole da biste pomešali. Kratko centrifugirajte.

Postupak

- Uklonite CF PCR ploču iz cikličnog termostata.
- Dodajte 25 µl SSM u svaki bunarčić uzorka.
- Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CF PCR ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
- Protresite na 1200 o/min tokom 1 minuta.
- Centrifugirajte na 280 × g 1 minut.
- Postavite na ciklični termostat i pokrenite 2. SS program.
Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42.](#)
- Kada uzorci dostignu 4°C, držite jedan minut, a zatim odmah pređite na sledeći korak.

Očistite cDNK

Ovaj proces koristi SPB za prečišćavanje cDNK od neželjenih reakcionih komponenti. Zrna se peru dva puta svežim 80% etanolom. cDNK je eluiran pomoću RSB.

Priprema

- Pripremite sledeće reagense.

- SPB—Uverite se da su zrna na sobnoj temperaturi 30 minuta.
 - RSB—Ostavite na stranu za upotrebu u ovom postupku.
2. Pripremite svež 80% EtOH u konusnoj epruveti od 15 ml ili 50 ml.

Tabela 15 Pripremite svež 80% EtOH

Reagens	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke
100% Ethanol alcohol, čist	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml

3. Pomešajte svež 80% EtOH u vorteks mešalici.
4. Obeležite novu MIDI BIND1 ploču sa 96 bunarčića (cDNK vezivanje).
5. Pokrijte i ostavite na stranu.
6. Izdvojite magnet.

Postupak

Vezivanje

1. Uklonite CF PCR ploču iz cikličnog termostata.
2. Pomešajte SPB u vorteks mešalici 1 minut da bi se resuspendovala zrna.
3. Odmah dodajte 90 µl SPB u svaki bunarčić uzorka na BIND1 MIDI ploči.
Ako koristite korito za dispenciju SPB, uključite faktor prekomerne starosti od 1,05 kada alikvotirate dovoljno materijala po uzorku. Bacite sav preostali materijal nakon što SPB bude dodat svakom bunarčiću uzorka.
4. Prebacite celokupnu zapreminu (50 µl) svakog uzorka iz CF PCR ploče u odgovarajući bunarčić BIND1 MIDI ploče.
5. Bacite praznu CF PCR ploču.
6. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na BIND1 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
7. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
8. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
9. Postavite BIND1 MIDI ploču na magnetno postolje 5 minuta.
10. Koristite P200 pipetu podešenu na 200 µl da biste uklonili i bacili sav supernatant iz svakog bunarčića uzorka bez ometanja peleta zrna.

Pranje

1. Operite zrna na sledeći način.
 - a. Držite na magnetnom postolju i dodajte 200 µl svežeg 80% EtOH u svaki bunarčić.
 - b. Sačekajte 30 sekundi.
 - c. Uklonite i bacite sav supernatant iz svakog bunarčića.
2. Operite zrna po *drugi* put.
3. Uklonite preostali EtOH iz svakog bunarčića.
Koristite P20 pipetu sa finim vrhom.
4. Bacite neiskorišćeno 80% EtOH.

Eluiranje

1. Uklonite BIND1 MIDI ploču sa magnetnog postolja.
2. Okrenite gore-dole ili pomešajte RSB u vorteks mešalici.
3. Dodajte 22 µl RSB u svaki bunarčić uzorka.
4. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na BIND1 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
5. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
6. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 2 minuta.
7. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
8. Označite novu MIDI ploču PCF sa 96 bunarčića (prečišćeni cDNK fragmenti).
Ako se zaustavljate na [TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA na stranici 48](#), koristite PCR ploču.
9. Prebacite 20 µl svakog bunarčića uzorka BIND1 MIDI ploče u odgovarajući bunarčić PCF ploče.
10. Bacite praznu BIND1 MIDI ploču.
11. Dodajte 30 µl RSB u svaki bunarčić uzorka PCF ploče.
12. Pipetirajte radi mešanja 10 puta.
13. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na PCF ploču i držite je na ledu.
14. Vratite EPH3, FSM, RVT i SSM u skladište.
15. Ako obrađujete uzorke izvedene samo iz RNK (cDNK) i ne zaustavljate se na tački bezbednog zaustavljanja, pređite na [Obavite popravku kraja i A-repa na stranici 52](#).

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate, centrifugirajte PCF PCR ploču na 280 × g tokom 1 minuta i čuvajte na -25°C do -15°C do 7 dana.

Priprema za korake protokola

1. Uklonite DNK kontrole iz skladišta.
2. Izvadite epruvetu sa reagensom iz kutije i pratite uputstva za odmrzavanje.

Tabela 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno), (br. dela 20031119)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
TEB	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Fragmentovanje gDNK

Fragmentovanje gDNK

Ovaj proces fragmentira gDNK i generiše dsDNK fragmente sa propustima na položaju 3' ili 5'.

Priprema

1. Obavezno pratite preporuke u odeljku [Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26](#) da biste kvantifikovali uzorke.
2. Pripremite sledeći reagens.
 - TEB—Okrenite gore-dole ili pomešajte u vorteks mešalici.

Postupak

Pripremite ploču

1. Izaberite jednu od sledeće tri opcije za pripremu ploče.
 - **Opcija br. 1:** Obradite gDNK uzorke istovremeno sa cDNK uzorcima u PCF MIDI ploči.
 - a. Označite PCF MIDI ploču LP (priprema biblioteke).
 - b. Stavite na led i ostavite sa strane za upotrebu u [Prenos fragmentovane DNK na stranici 50](#).
 - **Opcija br. 2:** Obradite gDNK uzorke istovremeno sa cDNK uzorcima, a PCF PCR ploča je zamrznuta.
 - a. Odmrznite PCF PCR ploču do sobne temperature.
 - b. Centrifugirajte na 280 × g 1 minut.
 - c. Pipetirajte 10 puta radi mešanja.
 - d. Označite novu MIDI ploču LP sa 96 bunarčića (priprema biblioteke).
 - e. Prebacite svih 50 µl iz svakog uzorka iz PCF PCR ploče u odgovarajući bunarčić LP MIDI ploče.
 - f. Bacite PCF PCR ploču.
 - g. Nanesite lepljivu zaptivku ploče i stavite je na led dok ne obavite [Prenos fragmentovane DNK na stranici 50](#).
 - **Opcija br. 3:** Obradite samo gDNK uzorke.

- Označite novu MIDI ploču LP sa 96 bunarčića (priprema biblioteke).
- Ako se zaustavljate na [TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA na stranici 51](#), koristite PCR ploču.
- Pokrijte i ostavite sa strane za upotrebu u [Prenos fragmentovane DNK na stranici 50](#).

Razblažite gDNK

- Odmrznite gDNK uzorke i DNK kontrole na sobnoj temperaturi.
- Pipetirajte svaki gDNK uzorak 10 puta da biste ga pomešali.
- Kratko centrifugirajte epruvetu da biste prikupili kapljice.
- Okrenite gore-dole ili pomešajte TEB u vorteks mešalici.
- Koristite TEB za pripremu svakog gDNK uzorka u konačnoj zapremini od 52 µl. Pogledajte sledeću tabelu za unos količina i minimalne koncentracije na osnovu tipa uzorka. Analiza zahteva minimalnu koncentraciju ekstrakcije da bi se omogućilo najmanje 40 µl TEB u zapremini od 52 µl. Za DNK kontrole, koristite koncentraciju koja se nalazi na nalepnici epruvete. Da biste sprečili gubitak uzorka, nemojte pipetirati manje od 2 µl uzorka u ovaj rastvor.

Tip uzorka	Količina za unos (ng)	Minimalna koncentracija (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrola	40	Pogledajte nalepnicu epruvete

Fragment

- Dodajte 52 µl svakog gDNK uzorka u poseban bunarčić ultrazvučne epruvete.



OPREZ

Polako ubacite gDNK u epruvetu, vodeći računa da nema vazdušnih praznina na dnu epruvete. Za više informacija pogledajte [Analiza na stranici 29](#) i uputstva proizvođača.

- Zabeležite orijentaciju trake.
- Fragmentujte gDNK u fragmente pomoću ultrazvučnog uređaja.

Prenos fragmentovane DNK

- Uverite se da se raspored ploče sa uzorcima i indeksi za svaki uzorak podudaraju sa ciklusom koji ste izabrali za analizu pomoću TSO Comprehensive (EU) modul analize.
- Pratite uputstva proizvođača ultrazvučnog uređaja da biste oporavili uzorak.
Za neke tipove ultrazvučnih epruveta, centrifugiranje može biti neophodno za konsolidaciju uzorka u epruveti.
- Za svaki fragmentovani gDNK uzorak, koristite p20 pipetu sa finim vrhom da biste izvršili tri prenosa od 16,7 µl u prazan bunarčić LP MIDI ploče.
- Nanesite lepljivu zaptivku ploče na LP MIDI ploču.

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate, nanosite lepljivu zaptivku ploče na LP PCR ploču i centrifugirajte na 280 × g tokom 1 minuta. Skladištite na -25°C do -15°C do 7 dana.

Priprema za korake protokola

Proverite da li su podešeni programi cikličnog termostata nakon amplifikacije. Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42](#).

1. Pripremite kofu sa ledom.
2. Izvadite epruvetu sa reagensom iz kutije i pratite uputstva za odmrzavanje.

Tabela 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznuto), (br. dela 20031118)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
ERA1-A	Od -25°C do -15°C	Držati na ledu.	Obavite popravku kraja i A-repa
ERA1-B	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Obavite popravku kraja i A-repa
ALB1	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Adapteri za ligaciju
LIG3	Od -25°C do -15°C	Držati na ledu.	Adapteri za ligaciju
SUA1 (plavi poklopac)	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Adapteri za ligaciju
UMI (beli poklopac)	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Adapteri za ligaciju
STL	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Adapteri za ligaciju
EPM	Od -25°C do -15°C	Držati na ledu.	PCR indeks

Tabela 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno) kutija (br. dela 20031119)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
SPB (svetlozelena nalepnica)	Od 2°C do 8°C	Ostavite 30 minuta da dostigne sobnu temperaturu.	Očistite ligaciju
RSB	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Očistite ligaciju

Tabela 19 TruSight Oncology Comp UP Index Primers kutija (br. dela 20031120)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
UPxx	Od -25°C do -15°C	Odmrznite odgovarajuće epruvete sa indeksnim prajmerom do sobne temperature.	PCR indeks

Tabela 20 TruSight Oncology Comp CP kutija za indeksne prajmere (br. dela 20031126)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
CPxx	Od -25°C do -15°C	Odmrznite odgovarajuće epruvete sa indeksnim prajmerom do sobne temperature.	PCR indeks

Obavite popravku kraja i A-repa

Ovaj proces popravljiva propuste koji nastaju zbog fragmentacije na krajevima sa propustom na A-repu, pomoću glavne smeše za popravku kraja A-repa (ERA1).

Aktivnost egzonukleaze od 3' do 5' ove smeše uklanja propuste na 3', a aktivnost polimeraze od 5' do 3' popunjava propuste na 5'. Krajevi 3' su A-repovi tokom ove reakcije kako bi se sprečila međusobna ligacija tokom reakcije ligacije adaptera.

Priprema

- Prethodno zagrejte 2 mikrouzorka inkubatora pomoću MIDI toplotnih blokova na sledeći način.
 - Prethodno zagrejte inkubator mikrouzorka na 30°C.
 - Prethodno zagrejte inkubator mikrouzorka na 72°C.
- Pripremite sledeće reagense.
 - ERA1-A—Kratko centrifugirajte, a zatim pipetirajte radi mešanja. Držati na ledu.
 - ERA1-B—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte. Proverite da li ima precipitata. Ako je prisutan, zagrejte epruvetu na 37°C, a zatim pipetirajte radi mešanja dok se precipitat ne rastvori.
- Pripremite ERA1 glavnu smešu u epruveti mikrocentrifuge.

Tabela 21 ERA1 glavna smeša¹

Komponenta glavne smeše	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
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 Ova tabela uključuje prekomernu zapreminu. Za izračunavanja pogledajte odeljak [Rukovanje reagensima na stranici 33](#).

4. Pipetirajte polako 10 puta da biste osigurali homogenost, kratko centrifugirajte, a zatim stavite ERA1 glavnu smešu na led.
5. Izaberite odgovarajuću opciju dve sledeće opcije da biste pripremili ploču.
 - **Opcija br. 1:** Ako su uzorci u MIDI ploči:
 - Ponovo označite MIDI ploču LP2 (priprema biblioteke 2).Ako su neki uzorci u zasebnim MIDI pločama, premestite sve uzorke u odvojene bunarčiće iste MIDI ploče u skladu sa rasporedom ploče.
 - **Opcija br. 2:** Ako je ploča zamrznuta:
 - a. Odmrznite PCF PCR ploču ili LP PCR ploču do sobne temperature.
 - b. Centrifugirajte ploču na 280 × g 1 minut.
 - c. Pipetirajte 10 puta radi mešanja.
 - d. Označite novu MIDI LP2 ploču sa 96 bunarčića (priprema biblioteke 2).
 - e. Prebacite svih 50 µl iz svakog uzorka iz PCF PCR ploče ili LP PCR ploče u odgovarajući bunarčić LP2 MIDI ploče.
 - f. Bacite PCF PCR ili LP PCR ploču.

Postupak

1. Dodajte 10 µl ERA1 glavne smeše u svaki bunarčić uzorka u LP2 MIDI ploči.
2. Bacite preostalu ERA1 glavnu smešu.
3. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na LP2 MIDI ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
4. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
5. Inkubirajte u prethodno zagrejanom inkubatoru za mikrouzorke na 30°C tokom 30 minuta.
6. Odmah prebacite u drugi, unapred zagrejani inkubator za mikrouzorke i inkubirajte na 72°C tokom 20 minuta.
7. Stavite LP2 MIDI ploču na led 5 minuta.

Adapteri za ligaciju

Ovaj proces ligira adaptere na krajevima cDNK i/ili gDNK fragmenata.

TSO Comprehensive (EU) Analiza uključuje SUA1 adaptere i UMI adaptere.

- Koristite SUA1 adaptere sa RNK uzorcima.
- Koristite UMI adaptere sa DNK uzorcima.

Priprema

1. Pripremite sledeće reagense.

- ALB1—Pomešajte u vorteks mešalici u toku najmanje 10 sekundi, a potom kratko centrifugirajte.
- LIG3—Kratko centrifugirajte, a zatim pipetirajte radi mešanja. Držati na ledu.
- SUA1—Pomešajte u vorteks mešalici u toku najmanje 10 sekundi, a potom kratko centrifugirajte.
- UMI—Pomešajte u vorteks mešalici u toku najmanje 10 sekundi, a potom kratko centrifugirajte.
- STL—Ostavite na stranu za upotrebu u postupku.

Postupak

1. Uklonite LP2 MIDI ploču sa leda.
2. Dodajte 60 µl ALB1 u svaki bunarčić uzorka LP2 MIDI ploče. ALB1 je viskoznan rastvor; svedite formiranje mehurića na najmanju meru tokom pipetiranja.
3. Dodajte 5 µl LIG3 u svaki bunarčić uzorka.
4. Dodajte adaptere.
Nemojte kombinovati različite tipove adaptera zajedno.
 - **RNK bunarčići uzorka**—10 µl SUA1 (plavi poklopac) u svaki uzorak dobijen iz RNK.
 - **DNK bunarčići uzorka**—10 µl UMI (beli poklopac) u svaki uzorak izveden iz DNK.
5. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na LP2 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
6. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
7. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.
8. Pomešajte STL u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
9. Dodajte 5 µl STL u svaki bunarčić uzorka LP2 MIDI ploče.
10. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na LP2 MIDI ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
11. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.

Očistite ligaciju

Ovaj proces koristi SPB za prečišćavanje cDNK ili gDNK fragmenata koji su ligirani adapterima i uklanja neželjene proizvode. Zrna se peru dva puta svežim 80% etanolom. Uzorci ligirani adapterima eluiraju se pomoću RSB.

Priprema

1. Pripremite sledeće reagense.
 - SPB—Uverite se da su zrna na sobnoj temperaturi 30 minuta.
 - RSB—Ostavite na stranu za upotrebu u ovom postupku.
2. Pripremite svež 80% EtOH u konusnoj epruveti od 15 ml ili 50 ml.

Tabela 22 Priprema svežeg 80% etanola

Reagens	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
100% Ethanol alcohol, čist	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

3. Pomešajte svež 80% EtOH u vorteks mešalici.
4. Izdvojite magnet.

Postupak

Vezivanje

1. Pomešajte SPB u vorteks mešalici 1 minut da bi se resuspendovala zrna.
2. Odmah dodajte 112 µl SPB u svaki bunarčić uzorka u LP2 MIDI ploču.
Ako koristite korito za dispenciju SPB, uključite faktor prekomerne starosti od 1,05 kada alikvotirate dovoljno materijala po uzorku. Bacite sav preostali materijal nakon što SPB bude dodat svakom bunarčiću uzorka.
3. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na LP2 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
4. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
5. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
6. Postavite LP2 MIDI ploču na magnetno postolje 10 minuta.
7. Koristite P200 pipetu podešenu na 200 µl da biste uklonili i bacili sav supernatant iz svakog bunarčića uzorka bez ometanja peleta zrna.

Pranje

1. Operite zrna na sledeći način.
 - a. Držite na magnetnom postolju i dodajte 200 µl svežeg 80% EtOH u svaki bunarčić uzorka.
 - b. Sačekajte 30 sekundi.
 - c. Uklonite i bacite sav supernatant iz svakog bunarčića bez ometanja peleta zrna.
2. Operite zrna po *drugi* put.
3. Uklonite preostali EtOH iz svakog bunarčića.
Koristite P20 pipetu sa finim vrhom.
4. Bacite neiskorišćeno 80% EtOH.

Eluiranje

1. Uklonite LP2 MIDI ploču sa magnetnog postolja.
2. Okrenite gore-dole ili pomešajte RSB u vorteks mešalici.
3. Dodajte 27,5 µl RSB u svaki bunarčić uzorka.
4. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na LP2 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
5. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
6. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 2 minuta.
7. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
8. Označite novu PCR ploču LS sa 96 bunarčića (uzorci biblioteke).
9. Prebacite 25 µl svakog eluata iz LP2 MIDI ploče u odgovarajući bunarčić LS PCR ploče.
10. Bacite praznu LP2 MIDI ploču.

PCR indeks

U ovom koraku, fragmenti biblioteke se amplifikuju pomoću prajmera koji dodaju indeksne sekvence za multipleksiranje uzoraka. Dobijeni proizvod sadrži kompletnu biblioteku cDNK i/ili DNK fragmente okruženu adapterima potrebnim za generisanje klastera.

Priprema

1. Pripremite sledeće reagense.
 - EPS—Držati na ledu.
 - UPxx—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte. UPxx je indeksni prajmer izabran na ekranu Create Run (Kreiraj ciklus) u softveru Local Run Manager, tokom podešavanja ciklusa.
 - CPxx—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte. CPxx je indeksni prajmer izabran na ekranu Kreiraj ciklus u softveru Local Run Manager, tokom podešavanja ciklusa.

2. Uverite se da se indeksi za svaki uzorak podudaraju sa ciklusom planiranim na TSO Comprehensive (EU) modul analize tokom podešavanja ciklusa. Obavezno pratite uputstva u vezi sa izborom indeksa u odeljku [Broj biblioteka i izbor indeksa na stranici 36](#).

**OPREZ**

Nepodudaranja između uzoraka i indeksnih prajmera dovode do prijavljivanja netačnog rezultata usled gubitka pozitivne identifikacije uzorka.

Postupak

1. Dodajte 5 µl odgovarajućeg indeksnog prajmera (UPxx ili CPxx) u odgovarajući bunarčić uzorka u LS PCR ploči u skladu sa izabranim indeksima.

**OPREZ**

Rukujte i otvorite samo jednu epruvetu sa indeksnim prajmerom pojedinačno. Ponovo zatvorite svaku indeksnu epruvetu sa novim poklopcem odmah nakon upotrebe. Nemojte kombinovati indeksne prajmere zajedno.

2. Pomešajte EPM u vorteks mešalici tokom 5 sekundi, a potom kratko centrifugirajte.
3. Dodajte 20 µl EPM u svaki bunarčić uzorka.
4. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na LS PCR ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
5. Protresite na 1200 o/min tokom 1 minuta.
6. Vratite reagense za predamplifikaciju u skladište.

**OPREZ**

Obavite sve naredne korake u oblasti nakon amplifikacije kako biste sprečili prenos proizvoda za amplifikaciju.

7. Centrifugirajte LS PCR ploču na 280 × g 1 minut.
8. Postavite na unapred programirani ciklični termostat za post-amplifikaciju i pokrenite I-PCR program.
Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42](#).

NAPOMENA Ako nastavljate sa [Podešavanje prve hibridizacije na stranici 58](#), pratite uputstva za odmrzavanje reagenasa u koracima Priprema protokola.

9. Nakon završetka I-PCR programa, centrifugirajte LS PCR ploču na 280 × g tokom 1 minuta.
10. Ponovo označite ploču ALS (amplifikovani uzorci biblioteke).

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate proces, skladištite ALS PCR na -25°C do -15°C do 30 dana.

Priprema za korake protokola

1. Proverite da li su podešeni programi cikličnog termostata nakon amplifikacije. Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42](#).
2. Izvadite epruvetu sa reagensom iz kutije i pratite uputstva za odmrzavanje.

Tabela 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (br. dela 20031123)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
TCB1	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Podešavanje prve hibridizacije

Tabela 24 TruSight Oncology kutija za obogaćivanje komp. (zamrznuto), (br. dela 20031121)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
TCA1	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Podešavanje prve hibridizacije

Tabela 25 TruSight Oncology kutija kompleta koji sadrži komponente, (br. dela 20031122)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
OPR1 (crveni poklopac)	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Podešavanje prve hibridizacije
OPD2 (beli poklopac)	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Podešavanje prve hibridizacije

Podešavanje prve hibridizacije

Tokom ovog procesa, objedinjeni oligonukleotidi hibridizuju se u cDNK biblioteke i objedinjeni oligonukleotidi hibridizuju se u gDNK biblioteke pripremljene u odeljku [PCR indeks na stranici 56](#). Obogaćivanje ciljanih regiona zahteva dva koraka hibridizacije. U prvoj hibridizaciji, oligos se hibridizuje u cDNK i/ili gDNA biblioteke preko noći (8 sati do 24 sata).

Priprema

1. Pripremite sledeće reagense.
 - TCB1—Zagrejte epruvetu na 37°C tokom 5 minuta. Pomešajte u vorteks mešalici tokom 10 sekundi, a potom kratko centrifugirajte.
 - TCA1—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - OPR1—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - OPD2—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.

2. Ako je ALS PCR ploča uskladištena, odmrznite do sobne temperature i centrifugirajte na 280 × g tokom 1 minuta. Zatim pipetirajte radi mešanja.
3. Označite novu PCR ploču HYB1 sa 96 bunarčića (hibridizacija 1).

Postupak

1. Prebacite 20 µl svake cDNA i/ili gDNA biblioteke iz ALS PCR ploče u odgovarajući bunarčić na HYB1 PCR ploči.
2. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na ALS PCR ploču ALS i odložite je na stranu. U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
3. Proverite TCB1 na precipitate. Ako su prisutni, ponovo zagrejte epruvetu i pomešajte epruvetu u vorteks mešalici dok se kristali ne rastvore.
4. Dodajte 15 µl TCB1 u svaki bunarčić biblioteke u HYB1 PCR ploči.
5. Dodajte 10 µl TCA1 u svaki bunarčić biblioteke u HYB1 PCR ploči.
6. Dodajte sonde.
Nemojte kombinovati različite tipove sondi zajedno. Dodajte samo jedan skup sondi po bunarčiću.
 - RNK bunarčići biblioteke – 5 µl OPR1 (crveni poklopac) za svaku biblioteku izvedenu iz RNK.
 - DNK TSO Comprehensive (EU) bunarčići biblioteke - 5 µl OPD2 (beli poklopac) za svaku biblioteku izvedenu iz DNK za TSO Comprehensive (EU) obogaćivanje.
7. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na HYB1 PCR ploču.



OPREZ

Uverite se da ste potpuno zapečatili ivice i bunarčiće kako biste sprečili isparavanje.

8. Protresite na 1200 o/min tokom 2 minuta.
9. Postavite na ciklični termostat i pokrenite HYB1 program.
Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42](#).
10. Hibridizujte na 57°C najmanje 8 sati do maksimalno 24 sata.
11. Vratite reagense za hibridizaciju u skladište.
12. Čuvajte ALS PCR ploču na -25°C do -15°C do 30 dana.

Priprema za korake protokola

1. Na početku 2. dana izvadite epruvetu sa reagensom iz kutije i pratite uputstva za odmrzavanje.

Tabela 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (br. dela 20031123)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
SMB (tamnoplava nalepnica)	Od 2°C do 8°C	Ostavite 30 minuta da dostigne sobnu temperaturu.	Hvatanje jednog cilja Hvatanje drugog cilja
ET2	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Hvatanje jednog cilja Hvatanje drugog cilja
HP3	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Hvatanje jednog cilja Hvatanje drugog cilja Normalizovane biblioteke
TCB1	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Podlašavanje druge hibridizacije
RSB	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Hvatanje drugog cilja Čišćenje amplifikovane obogaćene biblioteke

Tabela 27 TruSight Oncology kutija za obogaćivanje komp. (zamrznuto), (br. dela 20031121)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
EE2	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Hvatanje jednog cilja Hvatanje drugog cilja Normalizovane biblioteke
EEW	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Hvatanje jednog cilja
TCA1	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Podlašavanje druge hibridizacije

Tabela 28 Analiza Kutija kompleta sa sadržajem (br. dela 20031122)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
OPR1 (crveni poklopac)	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Podlašavanje druge hibridizacije
OPD2 (beli poklopac)	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Podlašavanje druge hibridizacije

Hvatanje jednog cilja

Ovaj korak koristi SMB da uhvati sonde hibridizovane u ciljanim regionima od interesovanja. Zrna se peru tri puta pomoću EEV. Obogaćene biblioteke su eluirane svežom EE2 + HP3 smešom za eluciju i neutralisane pomoću ET2.

Priprema

1. Prethodno zagrejte inkubator za mikrouzorke pomoću MIDI umetka toplotnog bloka na 57°C.
2. Pripremite sledeće reagense.
 - EEW—pomešajte u vorteks mešalici 1 minut.
 - EE2—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - HP3—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - SMB—Uverite se da su zrna na sobnoj temperaturi 30 minuta. Obavezno koristite **SMB**, a ne SPB za ovaj postupak.
 - ET2—ostavite na stranu za upotrebu u postupku.
3. Pripremite svežu EE2 + HP3 smešu za eluciju u epruveti mikrocentrifuge.

Tabela 29 EE2 + HP3 smeša za eluciju za hvatanje jednog cilja

Komponente smeše za eluciju	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Ova tabela uključuje prekomernu zapreminu. Za izračunavanja pogledajte odeljak [Rukovanje reagensima na stranici 33](#).

4. Pomešajte u vorteks mešalici EE2 + HP3 smešu za eluciju, a potom kratko centrifugirajte. Odvojite sa strane za korak [Eluiranje na stranici 63](#).
5. Označite novu MIDI ploču CAP1 sa 96 bunarčića (hvatanje 1).
6. Izdvojite magnet.

Postupak

Vezivanje

1. Uklonite HYB1 PCR ploču iz cikličnog termostata.
2. Centrifugirajte HYB1 PCR ploču na 280 × g 1 minut.
3. Pomešajte SMB u vorteks mešalici 1 minut da bi se resuspendovala zrna.
4. Odmah dodajte 150 µl SMB u svaki bunarčić biblioteke CAP1 MIDI ploče.

Ako koristite korito za dispenciju SMB, uključite faktor prekomerne starosti od 1,15 kada alikvotirate dovoljno materijala po uzorku. Bacite sav preostali materijal nakon što SMB bude dodat svakom bunarčiću uzorka.

5. Podesite pipetu na 50 µl i prebacite celokupnu zapreminu iz svake biblioteke iz HYB1 PCR ploče u odgovarajući bunarčić CAP1 MIDI ploče.
6. Bacite praznu HYB1 PCR ploču.
7. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CAP1 MIDI ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
8. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
9. Inkubirajte u prethodno zagrejanom inkubatoru za mikrouzorke na 57°C tokom 25 minuta.
10. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
11. Držite je CAP1 MIDI ploču na magnetnom postolju, koristite P200 pipetu podešenu na 200 µl da biste uklonili i bacili sav supernatant bez ometanja peleta zrna.

**OPREZ**

Odmah pređite na sledeći korak ([Pranje na stranici 63](#)). Ne dozvolite da pelet zrna duže vremena bude bez prisustva tečnosti.

Pranje

1. Operite zrna na sledeći način.
 - a. Uklonite CAP1 MIDI ploču sa magnetnog postolja.
 - b. Dodajte 200 µl EEW u svaki bunarčić.
 - c. Podesite zapreminu pipete na 150 µl i pipetirajte da biste pomešali najmanje 10 puta. Uverite se da su sva zrna resuspendovana.



OPREZ

Uverite se da nema prisutnog peleta zrna, tako što ćete pažljivo aspirirati ukupan rastvor zrna bunarčića u vrh. Zatim pogledajte dno svakog bunarčića radi peleta. Postavite vrh pipete pod uglom prema peletu zrna tokom koraka pranja da biste izvukli pelet. Uverite se da je pelet zrna u potpunosti u rastvoru. Rastvor treba da bude tamno smeđe boje i da ima homogenu konzistenciju.

- d. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CAP1 MIDI ploču.
 - e. U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
 - f. Protresite na 1800 o/min tokom 4 minuta.
 - g. Inkubirajte u inkubatoru za mikrouzorke na 57°C tokom 5 minuta.
 - h. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
 - i. Držite je na magnetnom postolju i uklonite i bacite sav supernatant iz svakog bunarčića bez ometanja peleta zrna.
2. Operite zrna po *drugi* put.
3. Operite zrna po *treći* put.
4. Uklonite preostali supernatant iz svakog bunarčića.
Koristite P20 pipetu sa finim vrhom.

Eluiranje

1. Uklonite CAP1 MIDI ploču sa magnetnog postolja.
2. Pomešajte u vorteks mešalici svežu EE2 + HP3 smešu za eluciju, a potom kratko centrifugirajte.
3. Dodajte 17 µl EE2 + HP3 smeše za eluciju u svaki bunarčić biblioteke CAP1 MIDI ploče.
4. Bacite preostalu EE2 + HP3 smešu za eluciju.
5. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CAP1 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
6. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
7. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
8. Označite novu PCR ploču ELU1 sa 96 bunarčića (elucija 1).
9. Pomešajte ET2 u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
10. Dodajte 5 µl ET2 u svaki odgovarajući bunarčić biblioteke nove ELU1 PCR ploče.

11. Pažljivo prebacite 15 µl eluata iz svakog bunarčića biblioteke CAP1 MIDI ploče u odgovarajući bunarčić ELU1 PCR ploče.
12. Bacite praznu CAP1 MIDI ploču.
13. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na ELU1 PCR ploču.
14. U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
15. Protresite na 1200 o/min tokom 2 minuta.
16. Vratite EEW u skladište.

Podešavanje druge hibridizacije

Ovaj korak po drugi put vezuje ciljane regione obogaćenih cDNK i/ili gDNK biblioteka sa sondama za hvatanje. Druga hibridizacija obezbeđuje visoku specifičnost uhvaćenih regiona. Da biste osigurali optimalno obogaćivanje biblioteka, izvršite drugi korak hibridizacije na 57°C u toku najmanje 1,5 sati do maksimalno 4 sata.

Priprema

1. Pripremite sledeće reagense.
 - TCB1—Zagrejte epruvetu na 37°C tokom 5 minuta. Pomešajte u vorteks mešalici tokom 10 sekundi, a potom kratko centrifugirajte.
 - TCA1—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - OPR1—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - OPD2—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.

Postupak

1. Proverite TCB1 na precipitate. Ako je prisutna, ponovo zagrejte epruvetu i pomešajte je u vorteks mešalici dok se kristali ne rastvore.
2. Dodajte 15 µl TCB1 u svaki bunarčić biblioteke ELU1 PCR ploče.
3. Dodajte 10 µl TCA1 u svaki bunarčić biblioteke.
4. Dodajte sonde.

Nemojte kombinovati različite tipove sonde zajedno.

 - RNK bunarčići biblioteke – 5 µl OPR1 (crveni poklopac) za svaku biblioteku izvedenu iz RNK.
 - DNK TSO Comprehensive (EU) bunarčići biblioteke - 5 µl OPD2 (beli poklopac) za svaku biblioteku izvedenu iz DNK za TSO Comprehensive (EU) obogaćivanje.
5. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na ELU1 PCR ploču.

U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
6. Protresite na 1200 o/min tokom 2 minuta.
7. Postavite na ciklični termostat i pokrenite HYB2 program.

Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42](#).

8. Hibridizujte na 57°C tokom najmanje 1,5 sata do maksimalno 4 sata.
9. Vratite reagense za hibridizaciju u skladište.

Hvatanje drugog cilja

Ovaj korak koristi SMB da uhvati sonde hibridizovane u ciljanim regionima od interesovanja. Zrna se peru jednom pomoću RSB. Obogaćene biblioteke su eluirane svežom EE2 + HP3 smešom za eluciju i neutralisane pomoću ET2.

Priprema

1. Prethodno zagrejte inkubator za mikrouzorke pomoću MIDI umetka toplotnog bloka na 57°C.
2. Pripremite sledeće reagense.
 - EE2—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - HP3—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - SMB—Uverite se da su zrna na sobnoj temperaturi 30 minuta. Obavezno koristite **SMB**, a ne SPB za ovaj postupak.
 - RSB—Ostavite na stranu za upotrebu u ovom postupku.
 - ET2—ostavite na stranu za upotrebu u postupku.
3. Pripremite svežu EE2 + HP3 smešu za eluciju u epruveti mikrocentrifuge.

Tabela 30 EE2 + HP3 smeša za eluciju za hvatanje drugog cilja

Komponente smeše za eluciju	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
EE2	114 µl	228 µl	456 µl	684 µl	1368 µl
HP3	6 µl	12 µl	24 µl	36 µl	72 µl

Ova tabela uključuje prekomernu zapreminu. Za izračunavanja pogledajte odeljak [Rukovanje reagensima na stranici 33](#).

4. Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte. Odvojite sa strane za korak [Eluiranje na stranici 67](#).
5. Označite novu MIDI ploču CAP2 sa 96 bunarčića (hvatanje 2).
6. Izdvojite magnet.

Postupak

Vezivanje

1. Uklonite ELU1 PCR ploču iz cikličnog termostata.
2. Centrifugirajte ELU1 PCR ploču na 280 × g 1 minut.
3. Pomešajte SMB u vorteks mešalici 1 minut da bi se resuspendovala zrna.

4. Odmah dodajte 150 µl SMB u svaki bunarčić biblioteke na CAP2 MIDI ploči.
Ako koristite korito za dispenciju SMB, uključite faktor prekomerne starosti od 1,15 kada alikvotirate dovoljno materijala po uzorku. Bacite sav preostali materijal nakon što SMB bude dodat svakom bunarčiću uzorka.
5. Podesite pipetu na 50 µl i prebacite celokupnu zapreminu iz svake biblioteke iz ELU1 PCR ploče u odgovarajući bunarčić CAP2 MIDI ploče.
6. Bacite praznu ELU1 PCR ploču.
7. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CAP2 MIDI ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
8. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
9. Inkubirajte u inkubatoru za mikrouzorke na 57°C tokom 25 minuta.

NAPOMENA Ako nastavljate sa [Amplifikacija obogaćene biblioteke na stranici 68](#), pratite uputstva o odmrzavanju za reagense u odeljku Priprema za korake protokola.

10. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
11. Držite je CAP2 MIDI ploču na magnetnom postolju i koristite P200 pipetu podešenu na 200 µl da biste uklonili i bacili sav supernatant iz svakog bunarčića biblioteke bez ometanja peleta zrna.



OPREZ

Odmah pređite na sledeći korak ([Pranje na stranici 66](#)). Ne dozvolite da pelet zrna duže vremena bude bez prisustva tečnosti.

Pranje

1. Uklonite CAP2 MIDI ploču sa magnetnog postolja.
2. Okrenite gore-dole ili pomešajte RSB u vorteks mešalici.
3. Dodajte 200 µl RSB u svaki bunarčić.
4. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CAP2 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
5. Protresite na 1800 o/min tokom 4 minuta.
6. Postavite ploču na magnetno postolje 2 minuta.
7. Držite je CAP2 MIDI ploču na magnetnom postolju i uklonite i bacite sav supernatant bez ometanja peleta zrna.
8. Uklonite preostali supernatant iz svakog bunarčića.
Koristite P20 pipetu sa finim vrhom.

Eluiranje

1. Uklonite CAP2 MIDI ploču sa magnetnog postolja.
2. Pomešajte u vorteks mešalici svežu EE2 + HP3 smešu za eluciju, a potom kratko centrifugirajte.
3. Dodajte 22 µl EE2 + HP3 smeše za eluciju u svaki bunarčić biblioteke CAP2 MIDI ploče.
4. Bacite preostalu EE2 + HP3 smešu za eluciju.
5. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na CAP2 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
6. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
7. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
8. Označite novu PCR ploču ELU2 sa 96 bunarčića (elucija 2).
9. Pomešajte ET2 u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
10. Dodajte 5 µl ET2 u svaki odgovarajući bunarčić biblioteke nove ELU2 PCR ploče.
11. Pažljivo prebacite 20 µl eluata iz svakog bunarčića biblioteke CAP2 MIDI ploče u odgovarajući bunarčić ELU2 PCR ploče.
12. Bacite praznu CAP2 MIDI ploču.
13. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na ELU2 PCR ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
14. Protresite na 1200 o/min tokom 2 minuta.
15. Vratite SMB, EE2, HP3 i ET2 u skladište.

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate, centrifugirajte ELU2 PCR ploču na 280 × g tokom 1 minuta i čuvajte na -25°C do -15°C do 7 dana. Vratite RSB u skladište.

Priprema za korake protokola

1. Pripremite kofu sa ledom.
2. Izvadite epruvetu sa reagensom iz kutije i pratite uputstva za odmrzavanje.

Tabela 31 TruSight Oncology kutija za obogaćivanje komp. (zamrznuto), (br. dela 20031121)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
PPC3	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Amplifikacija obogaćene biblioteke
EPM	Od -25°C do -15°C	Držati na ledu.	Amplifikacija obogaćene biblioteke

Tabela 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (br. dela 20031123)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
SPB (svetlozelena nalepnica)	Od 2°C do 8°C	Ostavite 30 minuta da dostigne sobnu temperaturu.	Čišćenje amplifikovane obogaćene biblioteke
RSB	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Čišćenje amplifikovane obogaćene biblioteke Priprema skupa za sekvenciranje

Amplifikacija obogaćene biblioteke

Ovaj korak koristi prajmere za amplifikaciju obogaćenih biblioteka.

Priprema

1. Ako je ploča ELU2 uskladištena, odmrznite je do sobne temperature, a zatim centrifugirajte na 280 × g tokom 1 minuta.

Postupak

1. Pomešajte PPC3 u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
2. Dodajte 5 µl PPC3 u svaki bunarčić biblioteke ELU2 PCR ploče.
3. Pomešajte EPM u vorteks mešalici u toku 5 sekundi, a potom kratko centrifugirajte.
4. Dodajte 20 µl EPM u svaki bunarčić biblioteke.
5. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na ELU2 PCR ploču.
U potpunosti zatvorite ivice i bunarčiće da biste sprečili isparavanje.
6. Protresite na 1200 o/min tokom 2 minuta.
7. Postavite na ciklični termostat i pokrenite EL-PCR program.
Pogledajte [Programi cikličnih termostata na stranici 42](#).

Napomena Ako nastavljate sa [Normalizovane biblioteke na stranici 71](#), pratite uputstva o odmrzavanju u odeljku Priprema za korake protokola.

8. Vratite PPC3 i EPM u skladište.

Čišćenje amplifikovane obogaćene biblioteke

Ovaj korak koristi SPB za prečišćavanje obogaćenih biblioteka od neželjenih reakcionih komponenata. Zrna se peru dva puta svežim 80% etanolom. Biblioteke su eluirane sa RSB.

Priprema

- Pripremite sledeće reagensse.
 - SPB—Uverite se da su zrna na sobnoj temperaturi 30 minuta. Obavezno koristite **SPB**, a ne **SMB** za ovaj postupak.
 - RSB—Ostavite na stranu za upotrebu u ovom postupku.
- Pripremite svež 80% etanol u konusnoj epruveti od 15 ml ili 50 ml.

Tabela 33 Priprema svežeg 80% etanola

Reagens	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
100% Ethanol alcohol, čist	2 ml	4 ml	8 ml	12 ml	24 ml
RNase/DNase-free water	500 µl	1 ml	2 ml	3 ml	6 ml

- Pomešajte svež 80% EtOH u vorteks mešalici.
- Označite novu MIDI ploču BIND2 sa 96 bunarčića (očistite vezivanje).
- Izdvojite magnet.

Postupak

Vezivanje

- Uklonite ELU2 PCR ploču iz cikličnog termostata.
- Centrifugirajte ELU2 PCR ploču na 280 × g 1 minut.
- Pomešajte SPB u vorteks mešalici 1 minut da bi se resuspendovala zrna.
- Odmah dodajte 110 µl SPB u svaki bunarčić biblioteke na BIND2 MIDI ploči.
- Prebacite 50 µl iz svake biblioteke iz ELU2 PCR ploče u odgovarajući bunarčić BIND2 MIDI ploče.
- Bacite praznu ELU2 PCR ploču.
- Nanesite lepljivu zaptivku ploče na BIND2 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
- Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
- Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
- Postavite ploču na magnetno postolje 5 minuta.
- Koristite P200 pipetu podešenu na 200 µl da biste uklonili i bacili sav supernatant iz svakog bunarčića biblioteke bez ometanja peleta zrna.

Pranje

- Operite zrna na sledeći način.
 - Držite na magnetnom postolju i dodajte 200 µl svežeg 80% EtOH u svaki bunarčić.
 - Sačekajte 30 sekundi.
 - Uklonite i bacite sav supernatant iz svakog bunarčića uzorka bez ometanja peleta zrna.
- Operite zrna po *drugi* put.
- Uklonite preostali EtOH iz svakog bunarčića.
Koristite P20 pipetu sa finim vrhom.
- Bacite neiskorišćeno 80% EtOH.

Eluiranje

- Uklonite BIND2 MIDI ploču sa magnetnog postolja.
- Okrenite gore-dole ili pomešajte u vorteks mešalici da biste pomešali RSB.
- Dodajte 32 µl RSB u svaki bunarčić biblioteke.
- Nanesite lepljivu zaptivku ploče na BIND2 MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
- Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
- Inkubirajte na sobnoj temperaturi 2 minuta.
- Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
- Označite novu PCR ploču PL sa 96 bunarčića (prečišćene biblioteke).
- Prebacite 30 µl svakog eluata iz BIND2 MIDI ploče u odgovarajući bunarčić PL PCR ploče.
- Bacite praznu BIND2 MIDI ploču.
- Nanesite lepljivu zaptivku ploče na PL PCR ploču.
- Vratite SPB u skladište.

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate, centrifugirajte PL PCR ploču na 280 × g tokom 1 minuta i čuvajte na -25°C do -15°C do 30 dana. Vratite RSB u skladište.

Priprema za korake protokola

- Izvadite epruvetu sa reagensom iz kutije i pratite uputstva za odmrzavanje.

Tabela 34 TruSight Oncology kutija za obogaćivanje komp. (zamrznuto), (br. dela 20031121)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
LNA1	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Normalizovane biblioteke

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
EE2	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature.	Normalizovane biblioteke

Tabela 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (br. dela 20031123)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
LNB1	Od 2°C do 8°C	Ostavite 30 minuta da dostigne sobnu temperaturu.	Normalizovane biblioteke
HP3	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Normalizovane biblioteke Priprema skupa za sekvenciranje
LNW1	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Normalizovane biblioteke
LNS1	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Normalizovane biblioteke

- Ako nastavljate istog dana sa [Priprema skupa za sekvenciranje na stranici 75](#), pratite uputstva za odmrzavanje u odeljku Priprema za korake protokola.

Normalizovane biblioteke

Ovaj postupak koristi LNB1 plus aditive (LNA1) za normalizaciju količine svake biblioteke kako bi se obezbedila uniformna zastupljenost biblioteke u objedinjenim bibliotekama. Zrna se peru dva puta pomoću LNW1. Biblioteke su eluirane svežom EE2 + HP3 smešom za eluciju i neutralisane pomoću LNS1.

Priprema

- Pripremite sledeće reagense.
 - LNB1—Uverite se da su zrna na sobnoj temperaturi 30 minuta.
 - LNA1—Pomešajte u vorteks mešalici.
 - EE2—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - HP3—Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
 - LNW1—Pomešajte u vorteks mešalici. Ostavite na stranu za upotrebu u postupku.
 - LNS1—Pomešajte u vorteks mešalici. Ostavite na stranu za upotrebu u postupku.
- Pomešajte LNB1 u vorteks mešalici 1 minut da bi se resuspendovala zrna. Okrenite gore-dole LNB1 epruvetu da biste bili sigurni da su sve zrna resuspendovana.
- Pomoću P1000 podešene na 800 µl, pipetirajte LNB1 gore-dole 10 puta da biste osigurali resuspenziju.

4. Odmah pripremite svežu LNA1 + LNB1 glavnu smešu u konusnoj epruveti.

**OPREZ**

U potpunosti resuspendujte LNB1 pelet zrna na dnu epruvete da biste sprečili nekonzistentnu gustinu klastera.

Tabela 36 LNA1 + LNB1 glavna smeša

Komponenta glavne smeše	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
LNA1	305 µl	610 µl	1219 µl	1829 µl	3658 µl
LNB1	55 µl	110 µl	221 µl	331 µl	662 µl

Ova tabela uključuje prekomernu zapreminu. Za izračunavanja pogledajte odeljak [Rukovanje reagensima na stranici 33](#).

5. Pomešajte u vorteks mešalici LNA1 + LNB1 glavnu smešu. Odvojite sa strane za korak [Vezivanje na stranici 72](#).
6. Pripremite svežu EE2 + HP3 smešu za eluciju u epruveti mikrocentrifuge.

Tabela 37 EE2 + HP3 smeša za eluciju za normalizaciju biblioteka

Komponente smeše za eluciju	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
EE2	152 µl	304 µl	608 µl	912 µl	1824 µl
HP3	8 µl	16 µl	32 µl	48 µl	96 µl

Ova tabela uključuje prekomernu zapreminu. Za izračunavanja pogledajte odeljak [Rukovanje reagensima na stranici 33](#).

7. Pomešajte u vorteks mešalici svežu smešu za eluciju, a potom kratko centrifugirajte. Odvojite sa strane za korak [Eluiranje na stranici 73](#).
8. Ako je ploča PL PCR bila uskladištena, odmrznite je do sobne temperature, centrifugirajte na 280 × g 1 minut, a zatim pipetirajte da biste pomešali.
9. Označite novu MIDI ploču BBN sa 96 bunarčića (normalizacija zasnovana na zrnu).
10. Izdvojite magnet.

Postupak

Vezivanje

- Pomešajte u vorteks mešalici LNA1+LNB1 glavnu smešu.
- Odmah dodajte 45 µl LNA1 + LNB1 glavne smeše u svaki bunarčić biblioteke BBN MIDI ploče.
- Bacite preostalu LNA1 + LNB1 glavnu smešu.
- Prebacite 20 µl iz svake biblioteke iz PL PCR ploče u odgovarajući bunarčić BBN MIDI ploče.
- Nanesite lepljivu zaptivku ploče na BBN MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.

6. Protresite na 1800 o/min tokom 30 minuta.
7. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na PL PCR ploču i vratite je u skladište.
8. Postavite ploču na magnetno postolje 2 minuta.
9. Držite je na magnetnom postolju i koristite P200 pipetu da biste uklonili i bacili sav supernatant iz svakog bunarčića bez ometanja peleta zrna.

Pranje

1. Operite zrna na sledeći način.
 - a. Uklonite BBN MIDI ploču sa magnetnog postolja.
 - b. Dodajte 45 µl LNW1 u svaki bunarčić biblioteke.
 - c. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na BBN MIDI ploču.
 - d. U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
 - e. Protresite na 1800 o/min tokom 5 minuta.
 - f. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
 - g. Uklonite i bacite sav supernatant iz svakog bunarčića bez ometanja peleta zrna.
2. Operite zrna po *drugi* put.
3. Uklonite preostali supernatant iz svakog bunarčića.
Koristite P20 pipetu sa finim vrhom.

Eluiranje

1. Uklonite BBN MIDI ploču sa magnetnog postolja.
2. Pomešajte u vorteks mešalici svežu EE2 + HP3 smešu za eluciju, a potom kratko centrifugirajte.
3. Dodajte 32 µl EE2 + HP3 rastvora u svaki bunarčić biblioteke BBN MIDI ploče.
4. Bacite preostalu smešu za eluciju.
5. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na BBN MIDI ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
6. Protresite na 1800 o/min tokom 2 minuta.
7. Postavite na magnetno postolje 2 minuta.
8. Označite novu PCR ploču NL sa 96 bunarčića (normalizovane biblioteke).
9. Pažljivo prebacite 30 µl eluata iz svakog bunarčića biblioteke BBN MIDI ploče u odgovarajući bunarčić NL PCR ploče.



OPREZ

Ako su zrna aspirirane u vrhove pipete, sipajte zrna nazad na ploču na magnetnom postolju i sačekajte dok tečnost ne bude čista (~2 minuta) pre nego što pređete na sledeći korak postupka.

10. Bacite praznu BBN MIDI ploču.

11. Pomešajte u vorteks mešalici LNS1.
12. Dodajte 30 µl LNS1 u svaki bunarčić biblioteke u novu NL PCR ploču.
13. Pipetirajte radi mešanja pet puta.
14. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na NL PCR ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
15. Vratite LNB1, LNA1, EE2, LNW1 i LNS1 u skladište.

TAČKA BEZBEDNOG ZAUSTAVLJANJA

Ako zaustavljate, centrifugirajte NL PCR ploču na 280 × g tokom 1 minuta i čuvajte na -25°C do -15°C do 30 dana.

Priprema za korake protokola

Počnite sa pripremom potrošnog materijala za sekvenciranje iz NextSeq 550Dx kompleta reagenasa sa visokim izlazom v2.5 (300 ciklusa) (br. dela 20028871) najmanje sat vremena pre upotrebe.

1. Uklonite pufer za razblaživanje biblioteke (HT1) iz skladišta na temperaturi od -25°C na -15°C, odmrznite do sobne temperature, a zatim ga stavite na led.
2. Pratite uputstva za pripremu u *Referentnom vodiču za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000009513)* za druge potrošne materijale u kompletu.
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklusa)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 ciklusa)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 ciklusa)
3. Izvadite epruvetu sa reagensom iz kutije i pratite uputstva za odmrzavanje.

Tabela 38 TruSight Oncology kutija za obogaćivanje komp. (zamrznuto), (br. dela 20031121)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
PhiX Internal Control (PX3 ili PhiX)	Od -25°C do -15°C	Odmrznite do sobne temperature. Držati na ledu.	Priprema skupa za sekvenciranje

Tabela 39 TruSight Oncology Comp Enrichment. (rashlađeno) kutija (br. dela 20031123)

Reagens	Skladištenje	Uputstva za odmrzavanje	Korak protokola
HP3	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Priprema skupa za sekvenciranje
RSB (ružičasta nalepnica)	Od 2°C do 8°C	Dovedite do sobne temperature.	Priprema skupa za sekvenciranje

Priprema skupa za sekvenciranje

Priprema

1. Pregledajte smernice za [Broj biblioteka i izbor indeksa na stranici 36](#).
2. Označite dHP3 epruvetu mikrocentrifuge (razblažen HP3).
3. Označite dPhiX epruvetu mikrocentrifuge (razblažen PhiX).
4. Prethodno zagrejte toplotni blok na 96°C za epruvete mikrocentrifuge.
5. Pripremite kofu sa ledom.

Razblažite i denaturišite PhiX kontrolu

1. Pomešajte HP3 u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
2. Kombinujte sledeće zapremine u dHP3 epruveti mikrocentrifuge.
 - 10 µl HP3
 - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Pomešajte dHP3 u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
4. Okrenite gore-dole ili pomešajte RSB u vorteks mešalici.
5. Pomešajte PhiX kontrolu u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
6. Kombinujte sledeće zapremine u dPhiX epruveti mikrocentrifuge.
 - 8 µl RSB
 - 2 µl PhiX kontrola
7. Dodajte 10 µl dHP3 u dPhiX epruvetu.
8. Bacite dHP3 epruvetu.
9. Pomešajte dPhiX u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
10. Inkubirajte dPhiX na sobnoj temperaturi 5 minuta radi denaturacije.
11. Pomešajte HT1 u vorteks mešalici.
12. Odmah dodajte 980 µl unapred ohlađenog HT1 u dPhiX.
13. Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
14. Stavite dPhiX na led do upotrebe u pripremi za drugo razblaživanje.
Konačna koncentracija je 20 pM dPhiX.
15. Vratite PhiX, HP3 i RSB u skladište.

Objedinjene i denaturisane biblioteka za TSO Comprehensive (EU)

1. Ako je NL PCR ploča uskladištena, odmrznite je do sobne temperature, a zatim centrifugirajte na 280 × g tokom 1 minuta.

2. Pomoću multikanalne pipete podešene na 30 µl, lagano pipetirajte da biste pomešali biblioteke u NL PCR ploči pet puta.

Koristite nove vrhove za svaku biblioteku.



OPREZ

Pobrinite se za to da dobro pomešate biblioteke za optimalne performanse.

3. Izaberite jednu od sledećih opcija za objedinjavanje, denaturaciju i razblaživanje biblioteka.
 - **Opcija br. 1:** Sekvencirajte biblioteke izvedene iz RNK uzoraka i DNK uzoraka istovremeno. Pogledajte [Opcija br. 1: DNK i RNK biblioteke zajedno na stranici 76](#).
 - **Opcija br. 2:** Sekvencirajte biblioteke izvedene samo iz DNK uzoraka. Pogledajte [Opcija br. 2: Samo DNK biblioteke na stranici 77](#).
 - **Opcija br. 3:** Sekvencirajte biblioteke izvedene samo iz RNK uzoraka. Pogledajte [Opcija br. 3: Samom RNK biblioteke na stranici 78](#).

Opcija br. 1: DNK i RNK biblioteke zajedno

1. Označite PRL epruvetu mikrocentrifuge (objedinjene RNK biblioteke).
2. Označite PDL epruvetu mikrocentrifuge (objedinjene DNK biblioteke).
3. Prebacite 10 µl u svaku normalizovanu RNK (cDNK) biblioteku iz NL ploče u PRL epruvetu. Ne objedinjujte dve biblioteke sa istim indeksnim prajmerom.
4. Prebacite 10 µl iz svake normalizovane DNK biblioteke iz NL ploče u PDL epruvetu. Ne objedinjujte dve biblioteke sa istim indeksnim prajmerom.
5. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na NL PCR ploču. U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
6. Pomešajte u vorteks mešalici PRL i PDL epruvete.
7. Kratko centrifugirajte PRL i PDL epruvete.
8. Inkubirajte PRL i PDL epruvete u toplotnom bloku na 96°C tokom 2 minuta.
9. Postavite PRL i PDL epruvete na led 5 minuta.
10. Pomešajte u vorteks mešalici PRL i PDL epruvete, a potom kratko centrifugirajte.
11. Vratite PRL i PDL epruvete na led.

Pripremite prvo razblaženje

1. Označite DIL1 epruvetu mikrocentrifuge (razblaženje 1).
2. Prebacite 20 µl PDL u praznu DIL1 epruvetu.
3. Dodajte 5 µl PRL u DIL1.
4. Bacite PDL i PRL epruvete.
5. Dodajte 475 µl prethodno ohlađenog HT1 u DIL1 epruvetu (razblaženje 1:20).

6. Pomešajte u vorteks mešalici DIL1 epruvetu, a potom kratko centrifugirajte.

Pripremite drugo razblaženje

1. Označite DIL2 epruvetu mikrocentrifuge od 2,0 ml (razblaženje 2).
2. Prebacite 40 µl DIL1 u praznu DIL2 epruvetu.
3. Bacite DIL1 epruvetu.
4. Dodajte 1660 µl prethodno ohlađenog HT1 u DIL2 epruvetu (razblaženje 1:850).
5. Pomešajte u vorteks mešalici pripremljeni 20 pM dPhiX, a potom kratko centrifugirajte.
6. Dodajte 2,5 µl pripremljenog 20 pM dPhiX u DIL2 epruvetu.
7. Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
8. Učitajte 1300 µl DIL2 u odmrznutu patronu za reagense NextSeq 550Dx sa visokim izlazom v2 (300 ciklusa)
Za više informacija, pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000009513)*.
9. Bacite DIL2 epruvetu.
10. Centrifugirajte NL PCR ploču na 280 × g u trajanju od 1 minuta i čuvajte na -25°C do -15°C do 30 dana.
11. Pređite na sekvenciranje.
Za više informacija, pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000009513)*.

Opcija br. 2: Samo DNK biblioteke

1. Označite vrh poklopca PDL epruvete mikrocentrifuge (objedinjene DNK biblioteke).
2. Prebacite 10 µl iz svake normalizovane DNK biblioteke iz NL ploče u PDL epruvetu.
Ne objedinjujte dve biblioteke sa istim indeksnim prajmerom.
3. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na NL PCR ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
4. Nanesite mikrozaptivku „B” na NL PCR ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiće.
5. Pomešajte u vorteks mešalici PDL epruvetu.
6. Kratko centrifugirajte PDL epruvetu.
7. Inkubirajte PDL epruvetu u toplotnom bloku na 96°C tokom 2 minuta.
8. Postavite PDL epruvetu na led 5 minuta.
9. Pomešajte u vorteks mešalici PDL epruvetu, a potom kratko centrifugirajte.
10. Vratite PDL epruvetu na led.

Pripremite prvo razblaženje

1. Označite DIL1 epruvetu mikrocentrifuge (razblaženje 1).
2. Prebacite 10 µl PDL u praznu DIL1 epruvetu.
3. Bacite PDL epruvetu.
4. Dodajte 190 µl prethodno ohlađenog HT1 u DIL1 epruvetu (razblaženje 1:20).
5. Pomešajte u vorteks mešalici DIL1, a potom kratko centrifugirajte.

Pripremite drugo razblaženje

1. Označite DIL2 epruvetu mikrocentrifuge od 2,0 ml (razblaženje 2).
2. Prebacite 40 µl DIL1 u praznu DIL2 epruvetu.
3. Bacite DIL1 epruvetu.
4. Dodajte 1660 µl prethodno ohlađenog HT1 u DIL2 epruvetu (razblaženje 1:850).
5. Pomešajte u vorteks mešalici pripremljeni 20 pM dPhiX, a potom kratko centrifugirajte.
6. Dodajte 2,5 µl pripremljenog 20 pM dPhiX u DIL2 epruvetu.
7. Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
8. Učitajte 1300 µl DIL2 u odmrznutu patronu za reagense NextSeq 550Dx sa visokim izlazom v2 (300 ciklusa).
Za više informacija, pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000009513)*.
9. Bacite DIL2 epruvetu.
10. Centrifugirajte NL PCR ploču na 280 × g u trajanju od 1 minuta, a zatim čuvajte na -25°C do -15°C do 30 dana.
11. Pređite na sekvenciranje.
Za više informacija, pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000009513)*.

Opcija br. 3: Samom RNK biblioteke

1. Označite PRL epruvetu mikrocentrifuge (objedinjene RNK biblioteke).
2. Prebacite 10 µl u svaku normalizovanu RNK (cDNK) biblioteku iz NL ploče u PRL epruvetu.
Ne objedinjujte dve biblioteke sa istim indeksnim prajmerom.
3. Nanesite lepljivu zaptivku ploče na NL PCR ploču.
U potpunosti zapečatite ivice i bunarčiče.
4. Pomešajte u vorteks mešalici PRL epruvetu.
5. Kratko centrifugirajte PRL epruvetu.
6. Inkubirajte PRL epruvetu u toplotnom bloku na 96°C tokom 2 minuta.
7. Postavite PRL epruvetu na led 5 minuta.

8. Pomešajte u vorteks mešalici PRL epruvetu, a potom kratko centrifugirajte.
9. Vratite PRL epruvetu na led.

Pripremite prvo razblaženje

1. Označite DIL1 epruvetu mikrocentrifuge (razblaženje 1).
2. Prebacite 10 µl PRL u praznu DIL1 epruvetu.
3. Bacite PRL epruvetu.
4. Dodajte 190 µl prethodno ohlađenog HT1 u DIL1 epruvetu (razblaženje 1:20).
5. Pomešajte u vorteks mešalici DIL1, a potom kratko centrifugirajte.

Pripremite drugo razblaženje

1. Označite DIL2 epruvetu mikrocentrifuge od 2,0 ml (razblaženje 2).
2. Prebacite 40 µl DIL1 u praznu DIL2 epruvetu.
3. Bacite DIL1 epruvetu.
4. Dodajte 1646 µl prethodno ohlađenog HT1 u DIL2 epruvetu (razblaženje 1:843).
5. Pomešajte u vorteks mešalici pripremljeni 20 pM dPhiX, a potom kratko centrifugirajte.
6. Dodajte 16,7 µl pripremljenog 20 pM dPhiX u DIL2 epruvetu.
7. Pomešajte u vorteks mešalici, a potom kratko centrifugirajte.
8. Učitajte 1300 µl DIL2 u odmrznutu patronu za reagense NextSeq 550Dx sa visokim izlazom v2 (300 ciklusa).
Za više informacija, pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000009513)*.
9. Bacite DIL2 epruvetu.
10. Centrifugirajte NL PCR ploču na 280 × g u trajanju od 1 minuta i čuvajte na -25°C do -15°C do 30 dana.
11. Pređite na sekvenciranje.
Za više informacija, pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (br. dokumenta 1000000009513)*.

Tumačenje rezultata

Rezultati sekvenciranja iz TSO Comprehensive (EU) analize prijavljuju se za svaki uzorak pojedinačno u PDF izveštaju i JSON izveštaju. Izveštaj niske dubine (`LowDepthReport.tsv`) se takođe generiše na nivou uzorka.

Na nivou ciklusa generišu se sledeće izlazne datoteke:

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

Samo varijante koje prolaze kontrolu kvaliteta pojavljuju se u PDF i JSON izveštajima.

Za detaljne informacije o analizi, pogledajte Vodič za tok rada modula za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (br. dokumenta 200008661).

Rezultati prateće dijagnostike

Za svaku prateću dijagnostičku (CDx) predviđenu upotrebu, postoje tri moguća rezultata:

- **Pozitivno**—varijanta se detektuje i klasifikuje kao nivo 1 (CDx).
- **Nije detektovano**—u uzorku nisu detektovane nikakve varijante ili biomarkeri povezani sa nameravanom upotrebom CDx. Tip tumora odabran za uzorak je odgovarajući za CDx.
- **Nema rezultata**—određivanje statusa varijante nije moguće iz jednog ili više sledećih razloga:
 - Namena CDx nije bila primenljiva na testirani uzorak jer tip tumora odabran za uzorak nije odgovarajući za tip tumora CDx.
 - Ciklus sekvenciranja nije ispunio specifikacije kontrole kvaliteta.
 - Biblioteka nije uspeła da zahteva specifikacije kontrole kvaliteta.
 - Odgovarajuća nukleinska kiselina nije pokrenuta.

Svi CDx rezultati namenjeni za upotrebu navedeni su u odeljku Rezultati prateće dijagnostike u JSON izveštaju. Samo namenjene upotrebe sa pozitivnim rezultatom navedene su u odeljku Rezultati prateće dijagnostike u PDF izveštaju.

Varijante profilisanja tumora

TSO Comprehensive (EU) je dizajniran da prijavi somatske varijante prilikom izveštavanja o varijantama sa dokazima o kliničkom značaju ili varijantama sa potencijalnim kliničkim značajem. Softver za TSO Comprehensive (EU) analizu koristi KB koji određuje da li je svaka detektovana i podobna varijanta ([Tabela 2](#)) klinički značajna ili potencijalno klinički značajna na osnovu dokaza o terapijskoj, dijagnostičkoj ili prognostičkoj povezanosti. KB takođe uzima u obzir da li su povezanosti uspostavljene (ili ne) u testiranom tipu tumora. Povezanost osetljivosti ili rizika od karcinoma nije uključena u KB. Uobičajeni polimorfizmi se uklanjaju.

Za varijante profilisanja tumora, pozitivni rezultati se klasifikuju u genomske nalaze sa dokazima o kliničkom značaju ili genomske nalaze sa potencijalnim kliničkim značajem prema instaliranom KB i identifikovanom tipu tumora.

Neuspesi kontrole kvaliteta dovode do toga da nema rezultata za tipove varijanti koje su relevantne za neuspeli pokazatelj kontrole kvaliteta. Pogledajte [Tabela 40](#) i [Tabela 41](#) za više informacija. Pozicije profilisanja tumora sa nedovoljnom dubinom navedene su u Izveštaju o niskoj dubini, a ne u TSO Comprehensive (EU) izveštaju.

Kontrola kvaliteta

- Informacije o kvantifikaciji nukleinske kiseline i minimalnim zahtevima ulaznog materijala potražite u odeljku [Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26](#).
- Ciklus sekvenciranja i validnost uzorka se automatski određuju i prijavljuju od strane TSO Comprehensive (EU) modul analize. Za detaljne informacije o analizi, pogledajte Vodič za tok rada modula za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (br. dokumenta 200008661).

Tabela 40 TSO Comprehensive (EU) Pokazatelji rezultata izveštaja kontrole kvaliteta

Tip izlaza	Pokazatelj	Specifikacija	Opis	Uticaj neuspeha specifikacije*
Ciklus sekvenciranja	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Procenat očitavanja prolaznog filtera (PF).	Ciklus sekvenciranja je nevažeci, nema prijavljenih rezultata za bilo koji uzorak u ciklusu.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Prosečan procenat pozivanja baza sa rezultatom kvaliteta od Q30 ili više za očitavanje 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Prosečan procenat pozivanja baza sa rezultatom kvaliteta od Q30 ili više za očitavanje 2.	

Tip izlaza	Pokazatelj	Specifikacija	Opis	Uticaj neuspeha specifikacije*
DNK biblioteke	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3106 ILI > 3106 i P_VALUE $\leq 0,049$	Pokazatelj koji procenjuje verovatnoću kontaminacije korišćenjem VAF uobičajenih varijanti. Rezultat kontaminacije se zasniva na VAF distribuciji SNP. P vrednost kontaminacije koja se koristi za procenu visoko preuređenih genoma, primenljiva je samo kada je rezultat kontaminacije iznad gornje navedene granice.	Nema prijavljenih DNK rezultata.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	Srednja dužina fragmenta u uzorku.	Nisu prijavljeni rezultati za TMB ili male DNK varijante.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (broj)	≥ 150	Srednja pokrivenost fragmenta egzona u svim bazama egzona.	
	PCT_EGZON_50X (%)	$\geq 90,0$	Procenat baza eksona sa pokrivenošću fragmenta 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (broj)	≥ 40	Broj MSI lokacija koje se mogu koristiti za MSI pozivanje (broj lokacija mikrosatelita sa dovoljnim rasponom očitavanja za identifikaciju nestabilnosti mikrosatelita).	Nema prijavljenih MSI rezultata.
	COVERAGE_MAD (broj)	$\leq 0,210$	Medijana apsolutnih odstupanja od medijane normalizovanog broja svakog CNV ciljnog regiona.	Nema prijavljenih rezultata amplifikacije gena.
	SREDNJI_BIN_BROJ_CNV_CILJ (broj)	$\geq 1,0$	Srednja vrednost sirovog broja bina po CNV cilju.	

Tip izlaza	Pokazatelj	Specifikacija	Opis	Uticaj neuspeha specifikacije*
RNK biblioteke	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80,0	Srednja dužina fragmenta u uzorku.	Nema prijavljenih rezultata za fuzije ili varijante spajanja.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeficijent)	≤ 0,93	MEDIAN_CV_GENE_500X je mera ujednačenosti pokrivenosti. Za svaki gen sa pokrivenošću od najmanje 500x, izračunava se koeficijent varijacije u pokrivenosti širom tela gena. Ovaj pokazatelj je medijana ovih vrednosti. Visoka vrednost ukazuje na visok nivo varijacije i ukazuje na problem u pripremi biblioteke, kao što su problemi sa niskim unosom uzorka i/ili povlačenjem sonde. Ovi pokazatelji se izračunavaju pomoću svih očitavanja (uključujući očitavanja označena kao duplikati).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (broj)	≥ 9.000.000	Ukupan broj očitavanja koji mapiraju do ciljnih regiona. Ovi pokazatelji se izračunavaju pomoću svih očitavanja (uključujući očitavanja označena kao duplikati).	

* Uspešni rezultati pokazuju PASS (USPEŠNO).

Tabela 41 TSO Comprehensive (EU) Pokazatelji rezultata izveštaja kontrole

Tip izlaza	Pokazatelj	Specifikacija	Uticaj neuspjeha specifikacije*
Pozitivna kontrola	DNK eksterna kontrola	Detektovano je 23 od 24 specifične varijante	Ručno poništite uzorke pacijenta na osnovu rezultata kontrolnog uzorka. Softver modula za analizu ne poništava automatski uzorke pacijenata na osnovu rezultata kontrolnih uzoraka.
	RNK eksterna kontrola	Detektovano je 12 od 13 specifičnih varijanti	
Kontrola bez predloška	DNK srednja pokrivenost egzona za TSO Comprehensive (EU)	≤ 8	Ručno poništite uzorke pacijenta na osnovu rezultata kontrolnog uzorka. Softver modula za analizu ne poništava automatski uzorke pacijenata na osnovu rezultata kontrolnih uzoraka.
	RNK gen iznad preseka medijane	≤ 1	

* Uspešni rezultati pokazuju PASS (USPEŠNO).

- TSO Comprehensive (EU) izveštaj, koji je dostupan u PDF i JSON formatima, sumira rezultate kontrole kvaliteta. Izveštaji su u fascikli za analizu. Pogledajte Vodič za tok rada modula za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (br. dokumenta 200008661) za lokaciju fascikle za analizu (sadrži PDF i JSON izveštaje) i fasciklu za cikluse.
- Ponovite sekvenciranja koje su nevažeća.
- Ponovite testove biblioteka sa sledećim rezultatima:
 - Zagađene DNK biblioteke
 - Nevažeće RNK biblioteke
 - Testovi se mogu ponoviti kako bi se dobilo više rezultata varijanti ili biomarkera za DNK biblioteke koje su nevažeće za jednu, ali ne i za sve tipove varijanti.
- Pozitivne kontrole se procenjuju za pozivanje varijante. Ako pozitivne kontrole ne zadovoljavaju specifikacije za pozivanje varijante, ručno poništite ciklus sekvenciranja. Softver modula za analizu ne poništava automatski uzorke pacijenata na osnovu rezultata kontrolnih uzoraka.
- NTC se procenjuju u odnosu na srednju pokrivenost egzonom za DNK i gene iznad preseka medijane za RNK. Ako negativne kontrole ne ispunjavaju specifikacije, ručno poništite događaj pripreme biblioteke i sve povezane cikluse sekvenciranja. Softver modula za analizu ne poništava automatski uzorke pacijenata na osnovu rezultata kontrolnih uzoraka.
- Izvršite dodatna merenja kontrole kvaliteta u skladu sa lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima ili zahtevima za akreditaciju.

Za više informacija o ponavljanju ciklusa sekvenciranja ili testova biblioteka, pogledajte [Rešavanje problema na stranici 85](#).

Rešavanje problema

Koristite sledeću tabelu da biste rešili probleme u toku rada. Ako ciklus sekvenciranja ili priprema biblioteke za uzorak ne uspe dva puta, možda će biti potrebno dodatno rešavanje problema. Obratite se Illumina tehničkoj podršci.

Opservacija	Mogući razlog	Preporučena radnja
Ciklus sekvenciranja ne prolazi specifikacije kontrole kvaliteta ciklusa	Greška u korišćenju ili laboratorijskoj opremi u toku rada analize	<p>Ponovite pripremu biblioteke iz jednog od sledećih koraka u zavisnosti od toga gde se dogodila sumnja na grešku u upotrebi ili u opremi. Ako to nije poznato, ili su se pojavile druge greške, obratite se Illumina tehničkoj podršci da biste rešili problem sa vašim ciklusom.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resekvencirane biblioteke iz normalizovanih biblioteka (NL) PCR ploče. Pogledajte odeljak Priprema skupa za sekvenciranje na stranici 75. • Ponovo obogatite biblioteke iz amplifikovanih uzoraka biblioteka (ALS) PCR ploče. Pogledajte odeljak Podešavanje prve hibridizacije na stranici 58. • Počnite pripremu biblioteke sa početka toka rada. Pogledajte odeljak Denaturišite i zagrejte RNK na stranici 44 ili Fragmentovanje gDNK na stranici 49.
	Problem sa instrumentom	Obratite se Illumina tehničkoj podršci.
Greška pri generisanju izveštaja ili opšta greška instrumenta (greška u mreži, greške u učitavanju/poništanju učitavanja reagenasa itd.)	Problem sa softverom ili instrumentom	<p>Pogledajte Vodič za tok rada modula za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (br. dokumenta 200008661) za pomoć u vezi sa generisanjem izveštaja. Obratite se tehničkoj podršci kompanije Illumina za dodatnu pomoć.</p>

Opservacija	Mogući razlog	Preporučena radnja
DNK biblioteka ne prolazi specifikacije kontrole kvaliteta	Zahtevi za unos uzorka nisu ispunjeni	Obezbedite odgovarajući unos uzorka i ponovite pripremu biblioteke iz koraka Fragmentovanje gDNK. Pogledajte odeljak Zahtevi za uzorke na stranici 26 i Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26 .
DNK biblioteka ne prolazi specifikacije kontrole kvaliteta (nastavak)	Greška u korišćenju ili u opremi u toku rada analize	<p>Ponovite pripremu biblioteke iz jednog od sledećih koraka u zavisnosti od toga gde se dogodila sumnja na grešku u upotrebi ili u opremi. Ako to nije poznato, ili su se pojavile druge greške, obratite se Illumina tehničkoj podršci da biste rešili problem sa vašim ciklusom.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resekvencirane biblioteke iz normalizovanih biblioteka (NL) PCR ploče. Pogledajte odeljak Priprema skupa za sekvenciranje na stranici 75. • Ponovo obogatite biblioteke iz amplifikovanih uzoraka biblioteka (ALS) PCR ploče. Pogledajte odeljak Podešavanje prve hibridizacije na stranici 58. • Počnite pripremu biblioteke sa početka toka rada. Pogledajte Fragmentovanje gDNK na stranici 49.
	CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE kriterijumi nisu ispunjeni	<p>Pregledajte upozorenja i mere opreza za informacije o izbegavanju unakrsne kontaminacije.</p> <p>Pregledajte raspored ploča i indeksiranje biblioteke kako biste bili sigurni da biblioteke istog indeksa nisu sekvencirane zajedno. Za pogođene biblioteke, počnite pripremu biblioteke sa početka toka rada. Pogledajte Fragmentovanje gDNK na stranici 49.</p> <p>Kontaminacija se može dogoditi tokom ekstrakcije uzorka. Možda će biti potrebno ponoviti ekstrakciju kako bi se osiguralo da uzorak nije kontaminiran.</p>

Opservacija	Mogući razlog	Preporučena radnja
	Upotrebljiva MSI nije uspela	Pregledajte podešavanja proizvođača ultrazvučnog uređaja za upotrebu i rad (uključujući nivo vode i tip epruvete). Obezbedite odgovarajući unos uzorka u analizu. Pogledajte odeljak Zahtevi za uzorke na stranici 26 i Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26 . Možda će biti potreban novi korak ekstrakcije uzorka i/ili ponavljanje fragmentovanja gDNK, ako je uzorak previše fragmentovan ili oštećen.
	Uzorak može biti previše fragmentovan ili imati oštećenje nukleinske kiseline, što utiče na sposobnost generisanja dovoljnih jedinstvenih biblioteka	Pregledajte podešavanja proizvođača ultrazvučnog uređaja za upotrebu i rad (uključujući nivo vode i tip epruvete). Obezbedite odgovarajući unos uzorka u analizu. Pogledajte odeljak Zahtevi za uzorke na stranici 26 i Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26 . Možda će biti potreban novi korak ekstrakcije uzorka i/ili ponavljanje fragmentovanja gDNK, ako je uzorak previše fragmentovan ili oštećen.
RNK biblioteka ne prolazi specifikacije kontrole kvaliteta	Zahtevi za unos uzorka nisu ispunjeni	Obezbedite odgovarajući unos uzorka i ponovite pripremu biblioteke iz koraka za denaturaciju i zagrevanje RNK. Pogledajte odeljak Zahtevi za uzorke na stranici 26 i Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26 .

Opservacija	Mogući razlog	Preporučena radnja
	Greška u korišćenju ili u opremi u toku rada analize	<p>Ponovite pripremu biblioteke iz jednog od sledećih koraka u zavisnosti od toga gde se dogodila sumnja na grešku u upotrebi ili u opremi. Ako to nije poznato, ili su se pojavile druge greške, obratite se Illumina tehničkoj podršci da biste rešili problem sa vašim ciklusom.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Resekvencirane biblioteke iz normalizovanih biblioteka (NL) PCR ploče. Pogledajte odeljak Priprema skupa za sekvenciranje na stranici 75. • Ponovo obogatite biblioteke iz amplifikovanih uzoraka biblioteka (ALS) PCR ploče. Pogledajte odeljak Podešavanje prve hibridizacije na stranici 58. • Počnite pripremu biblioteke sa početka toka rada. Pogledajte Denaturišite i zagrejte RNK na stranici 44.
	Uzorak može biti previše fragmentovan ili imati oštećenje nukleinske kiseline, što utiče na sposobnost generisanja dovoljnih jedinstvenih biblioteka	<p>Obezbedite odgovarajući unos uzorka. Pogledajte odeljak Zahtevi za uzorke na stranici 26 i Ekstrakcija, kvantifikacija i skladištenje nukleinske kiseline na stranici 26.</p> <p>Možda će biti potrebna nova ekstrakcije uzorka ako je uzorak previše fragmentovan ili oštećen.</p>

Opservacija	Mogući razlog	Preporučena radnja
Neuspeh pozitivne kontrole (DNK/RNK)	Nisu ispunjeni zahtevi za unos uzorka za pozitivnu kontrolu	Obezbedite odgovarajući unos u analizu. Pregledajte raspored ploče i uverite se da su odgovarajući reagensi (sonde, indeksi) u odgovarajućim bunarčićima. Uverite se da je uzorak za pozitivnu kontrolu skladišten u skladu sa oznakom. Za sve uzorke koji dele pozitivnu kontrolu, ponovite pripremu biblioteke iz jednog od sledećih koraka, u zavisnosti od toga gde se dogodila sumnja na grešku u upotrebi ili u opremi. Ako to nije poznato, ili su se pojavile druge greške, obratite se Illumina tehničkoj podršci da biste rešili problem sa vašim ciklusom.
	Greška u korišćenju ili u opremi u toku rada analize	<ul style="list-style-type: none"> • Resekvencirane biblioteke iz normalizovanih biblioteka (NL) PCR ploče. Pogledajte odeljak Priprema skupa za sekvenciranje na stranici 75. • Ponovo obogatite biblioteke iz amplifikovanih uzoraka biblioteka (ALS) PCR ploče. Pogledajte odeljak Podešavanje prve hibridizacije na stranici 58. • Počnite pripremu biblioteke sa početka toka rada. Pogledajte odeljak Denaturišite i zagrejte RNK na stranici 44 ili Fragmentovanje gDNK na stranici 49.
NTC neuspeh (DNK/RNK)	Došlo je do unakrsne kontaminacije ili kontaminacije radne površine	Pregledajte odeljak Upozorenja i mere opreza za informacije o dekontaminaciji radnih područja. Pregledajte upozorenja i mere opreza za informacije o izbegavanju unakrsne kontaminacije. Pregledajte raspored ploča i indeksiranje biblioteke kako biste bili sigurni da biblioteke istog indeksa nisu sekvencirane zajedno. Ponovite pripremu biblioteke sa početka toka rada za sve biblioteke koje dele kontrolu bez predloška.
	Netačno indeksiranje biblioteke	

Opservacija	Mogući razlog	Preporučena radnja
Softver ukazuje da pozitivne i/ili negativne kontrole nisu uključene u ciklus sekvenciranja	Nepravilno dodeljivanje tipa tumora u Local Run Manager planiranju ciklusa	Ponovno stavljanje analize u red čekanja sa pravilno identifikovanim kontrolama kao što je navedeno u Vodič za tok rada modula za analizu lokalnog menadžera ciklusa TruSight Oncology Comprehensive (EU) (br. dokumenta 200008661).

Karakteristike performansi

TSO Comprehensive (EU) je ciljani NGS panel sa 517 gena. Male DNK varijante—pojedinačne varijante nukleotida (SNV), višestruke varijante nukleotida (MNV), insercije i delecije—podobne su za izveštavanje iz svih 517 gena. Amplifikacije gena su podobne za izveštavanje iz MET i ERBB2 gena. Fuzije su podobne za izveštavanje iz 23 gena navedena u [TSO Comprehensive \(EU\) Panel analize gena na stranici 2](#). Varijante spajanja su podobne za izveštavanje iz MET i EGFR gena. Da bi bile prijavljene, varijante moraju biti detektovane i imati dokaze u TSO Comprehensive (EU) analizi KB i biti podobne na osnovu testiranog tipa tkiva. Da bi bile prijavljene, NTRK fuzije zahtevaju da partner za fuziju bude na 5', a da domen NTRK ili RET kinaze bude intaktan. Za male DNK varijante, reprezentativan pristup validaciji ciljanih gena u panelu sproveden je pomoću podataka koji predstavljaju SNV, MNV, insercije i delecije. Za amplifikacije gena, fuzije i varijante spajanja, testiranje je obavljeno na nivou gena. TMB i MSI su procenjeni tamo gde je naznačeno. Za tvrdnje CDx u NTRK fuziji, fuzije u FFPE uzorcima testirane su u studijama fokusiranim na performanse specifične za tvrdnju (kao što su granica detekcije, preciznost u okviru laboratorije, ponovljivost, tačnost i kliničke performanse).

[Tabela 42](#) pruža definicije pokazatelja izračunatih u različitim studijama.

Tabela 42 Definicije pokazatelja

Termin	Definicija
Procenat pozitivnog poklapanja (PPA)	Procenat pozitivnih poklapanja pravilno identifikovanih iz ukupnih pozitivnih poklapanja u odnosu na ortogonalnu metodu.
Procenat negativnog poklapanja (NPA)	Procenat negativnih poklapanja pravilno identifikovanih iz ukupnih negativnih poklapanja u odnosu na ortogonalnu metodu.
Ukupni procenat poklapanja (OPA)	Procenat pozitivnih i negativnih poklapanja pravilno identifikovanih iz ukupnih uočenih poklapanja u odnosu na ortogonalnu metodu.
Procenat pozitivnog podudaranja (PPC)	Procenat pozitivnih pozivanja pravilno identifikovanih iz ukupnih pozitivnih podudaranja u odnosu na kontrolno stanje u direktnom poređenju parova.
Procenat negativnog podudaranja (NPC)	Procenat negativnih pozivanja pravilno identifikovanih iz ukupnih negativnih podudaranja u odnosu na kontrolno stanje u direktnom poređenju parova.
Procenat pozitivnih pozivanja (PPC)	Procenat opservacija koje su pozitivne na cilj među opservacijama za koje se očekuje da budu pozitivne na cilj.
Procenat negativnih pozivanja (NPC)	Procenat opservacija koje su negativne na cilj među opservacijama za koje se očekuje da budu negativne na cilj.

Unakrsna kontaminacija

Sprovedena je studija unakrsne kontaminacije da bi se procenilo da li se lažno pozitivni rezultati događaju usled kontaminacije između bunarčića tokom pripreme biblioteke uzoraka i kontaminacije između ciklusa između uzastopnih ciklusa sekvenciranja za TSO Comprehensive (EU) analizu. Za procenu unakrsne kontaminacije

korišćena su dva DNK i dva RNK uzorka sa jedinstvenim i nepreklapajućim varijantama. Trideset dve DNK biblioteke i 32 RNK biblioteke su pripremljene tri puta od strane dva operatera u rasporedu kontrolne table sa naizmeničnim uzorcima, kako bi se procenila kontaminacija između bunarčića i sa naizmeničnim indeksima, kako bi se procenila kontaminacija između ciklusa sekvenciranja, kada se sekvenciranje uzastopno izvršava na istom Instrument NextSeq 550Dx. Da bi se procenila unakrsna kontaminacija, procenjene su male DNK varijante (koje takođe utiču na TMB) i RNK varijante (MSI i amplifikacije gena nisu procenjene). Studija unakrsne kontaminacije pokazala je nulte događaje kontaminacije uočene ispitivanjem detektovanih varijanti u svakom uzorku, bez detektovanih lažno pozitivnih rezultata.

Procena kompleta za ekstrakciju nukleinske kiseline

Tri komercijalno dostupna kompleta za ekstrakciju DNK i RNK procenjena su pomoću TSO Comprehensive (EU). Tri kompleta za ekstrakciju izolovala su i DNK i RNK iz istih FFPE delova tkiva. Kompleti su se razlikovali u koracima agensa za deparafinizaciju i vezivanja za nukleinsku kiselinu (Tabela 43). Komplet 1 je bio komplet za ekstrakciju koj je preovlađivao i koji se koristio za određivanje TSO Comprehensive (EU) performansi.

Tabela 43 Karakteristike kompleta

Komplet	Agens za deparafinizaciju	Vezivanje nukleinske kiseline
1	Vlasništvo	Kolona
2	Ksilen	Kolona
3	Mineralno ulje	Magnetna zrna

Sedam uzoraka (5 FFPE tkiva i 2 FFPE ćelijske linije) su ekstrahovani u duplikatu od strane 2 operatera, ponovljeno tokom 3 dana za svaki od 3 kompleta za ekstrakciju (7 uzoraka x 3 kompleta za ekstrakciju x 2 operatera za ekstrakciju x 3 dana za ekstrakciju x 2 replikata za ekstrakciju).

Tabela 44 sumira efekte kompleta za ekstrakciju na validnost biblioteke i pozivanje na varijante. Za validnost biblioteke prijavljena je najveća razlika u stopi između kompleta za ekstrakciju, a značaj je određen kvantitativnom analizom pokazatelja biblioteke. Za pozivanje na varijante, ako su srednje vrednosti kompleta za ekstrakciju bile značajno različite, prijavljena je razlika.

Uočeno je da kompleti za ekstrakciju utiču na pokazatelj validnosti biblioteke za male DNK varijante/TMB i MSI. Pokazatelji validnosti biblioteke za amplifikacije gena i RNK nisu se značajno razlikovali između kompleta za ekstrakciju. Kompleti za ekstrakciju nisu uticali na pozivanje na varijantu za male DNK varijante i TMB rezultat. Za MSI rezultat i amplifikacije gena nisu detektovani nikakvi lažno pozitivni rezultati, a kvantitativna analiza nije pronašla značajne razlike u negativnim uzorcima. Uočeno je da kompleti za ekstrakciju imaju različite prateće vrednosti očitavanja, tako da bi fuzije i varijante spajanja u blizini LoD mogle da budu propuštene zbog izbora kompleta za ekstrakciju.

Izabrani komplet za ekstrakciju treba da se koristi u laboratorijskoj verifikaciji karakteristika performansi TSO Comprehensive (EU) i da bi se obezbedila adekvatna validnost biblioteke.

Tabela 44 Uticaji kompleta za ekstrakciju na validnost biblioteke i pozivanje varijante

Tip varijante	Stopa validnosti biblioteke (najveća razlika)	Pozivanje na varijante (najveća srednja razlika u osnovnoj promenljivoj)
Male DNK varijante	Komplet 2 je značajno niži od kompleta 3 (10%)	Nije značajno
TMB		Nije značajno
MSI	Komplet 1 je značajno niži od kompleta 3 (14%)	Nisu detektovani lažno pozitivni rezultati Nisu procenjeni lažno negativni rezultati
Amplifikacija gena	Nije značajno (5%)	Nisu detektovani lažno pozitivni rezultati Nisu procenjeni lažno negativni rezultati
Fuzije	Nije značajno (3%)	Komplet 1 je značajno niži od kompleta 3 (11%)
Varijante spajanja		Komplet 1 je značajno niži od kompleta 3 (11%)

Ometajuće (interferirajuće) supstance

Uticaj potencijalnih endogenih i egzogenih supstanci na performanse TSO Comprehensive (EU) testa procenjen je na 16 jedinstvenih FFPE uzoraka iz mozga, tireoidne žlezde, debelog creva, dojke, pluća, prostate, kože i mekih tkiva. Endogene supstance, melanin i hemoglobin, dodati su u uzorke tokom procesa ekstrakcije nukleinske kiseline. Egzogene supstance (etanol, ksilen i proteinaza K) bile su prisutne tokom procesa ekstrakcije nukleinske kiseline, a takođe su dodate u prečišćenu nukleinsku kiselinu pre pripreme biblioteke. Dodavanje dodatne proteinaze K tokom procesa ekstrakcije takođe je procenjeno tamo gde je uočeno ometanje sa dodatkom proteinazom K. Postojala je endogena kontrola bez dodavanja i pufer ili egzogena kontrola sa dodatkom vodom za svaki od 16 jedinstvenih uzoraka. Efekat nekroze procenjen je na drugačijem skupu od osam FFPE uzoraka iz pluća, mozga i tkiva debelog creva. Za svaki uzorak nekroze postojala je makrodisecirana kontrola bez nekroze. Za sva ometanja, testirana su četiri replikata po uzorku po supstanci TSO Comprehensive (EU) testom i upoređena sa njihovom odgovarajućom kontrolom za detekciju malih DNK varijanti, amplifikacije gena, RNK fuzije i RNK varijanti spajanja, kao i za MSI status i TMB rezultat.

Detekcija DNK varijante

Melanin (0,2 µg/ml), hemoglobin (2 mg/ml), etanol (5%), proteinaza K (0,04 mg/ml) i ksilen (0,0001%) ne ometaju TMB rezultat, MSI status, male DNK varijante i amplifikacije gena.

Detekcija RNK varijante

Podaci podržavaju da nema ometanja hemoglobinom (2 mg/ml), melaninom (0,2 µg/ml), etanolom (5%), i ksilenom (0,0001%) na RNK fuzije ili varijante spajanja. Slično tome, nije bilo ometanja u detekciji RNK varijante kad je 0,02 mg/ml proteinaze K dodato u RNK pre događaja pripreme biblioteke i kada se u uzorak tokom

procesa prečišćavanja RNK doda do 2,6 mg/ml proteinaze K.

Neki lažno pozitivni rezultati u odnosu na kontrole koje nisu ometale, uočeni su između repliciranih biblioteka za RNK fuzije sa hemoglobinom, melaninom, etanolom i ksilenom, kao i za RNK varijante spajanja sa melaninom i ksilenom. Slično tome, neki lažno negativni rezultati uočeni su na nekim repliciranim bibliotekama za RNK varijante spajanja sa hemoglobinom, melaninom, ksilenom i 0,02 mg/ml proteinaze K. Međutim, u svim slučajevima lažno pozitivni i lažno negativni rezultati smatrani su problemima sa uzorkom jer su zapažanja za detektovane događaje pokazala da podržavaju očitavanja u blizini LoD. Stoga su se lažno pozitivni i lažno negativni rezultati u replikatima smatrali nepovezanim sa ometanjem i pripisivani su nasumičnoj varijaciji broja pratećih očitavanja za fuzije i/ili varijante spajanja pri ili ispod LoD.

Nekroza

Prisustvo nekrotičnog tkiva do 70% ne ometa TMB rezultat, MSI status, male DNK varijante ili detekciju RNK varijanti spajanja. RNK fuzije i detekcija amplifikacije gena utiču na uzorke sa sadržajem nekroze $\geq 25\%$ u oblasti tkiva. Ako uzorak isečka sadrži više od 25% nekroze u ukupnoj oblasti tkiva, onda nekrotično tkivo mora biti makrodisecirano.

Stabilnost

Stabilnost u realnom vremenu

Stabilnost u realnom vremenu korišćena je za utvrđivanje roka trajanja TSO Comprehensive (EU) kompleta za analizu, kada se čuva prema uslovima na nalepnici. Dizajn studije je zasnovan na testiranju 3 serije reagenasa i korišćen je dizajn studije klasične stabilnosti, opisan u dokumentu CLSI EP25-A. Kompleti su čuvani u konačnoj konfiguraciji kompleta tokom trajanja studije, u uslovima skladištenja definisanim na nalepnici proizvoda. Komponente zamrznutog kompleta su uskladištene na -15°C do -25°C . Rashlađene komponente kompleta su uskladištene na temperaturi od 2°C do 8°C . Komponente na sobnoj temperaturi uskladištene su na 15°C do 30°C .

Kompleti su testirani prema kriterijumima izgleda i funkcionalnog oslobađanja kompleta u određenim vremenskim tačkama. Takođe, analizirani su trendovi pokazatelja za pozivanje na varijantu i kontrolu kvaliteta uzorka za kontrolni materijal kontrole kvaliteta. Rok trajanja je određen za svaki reagens. Datumi isteka roka se dodeljuju na osnovu datuma proizvodnje i roka trajanja. Rok trajanja kompleta se dodeljuje na osnovu reagensa kome najranije ističe rok trajanja.

Stabilnost upotrebe kompleta

Stabilnost upotrebe TSO Comprehensive (EU) kompleta za analizu procenjena je pod standardnim uslovima korišćenja tokom roka trajanja, kako bi se podržalo više upotreba kompleta. Komplet reagenasa je podvrgnut višestrukom zamrzavanju/odmrzavanju i testiran da bi podržao do 4 upotrebe kompleta. Pored toga, 8 RNK i 8 DNK biblioteka pripremljeno je ukupno 3 puta za testiranje maksimalnog broja podržanih biblioteka (24 DNK i 24 RNK biblioteke po kompletu). Svi funkcionalni kriterijumi za oslobađanje kompleta su bili ispunjeni za sve

testirane cikluse zamrzavanja/odmrzavanja i vremenske tačke. Testiranje FFPE uzoraka sa reagensima starosti ≥ 25 meseci obavljeno je da bi se procenio uticaj testiranja u upotrebi na pozivanje varijante. Kvalitativna analiza ciljanih varijanti pokazuje da događaji u upotrebi nisu uticali na pozivanje varijante.

Stabilnost biblioteke

Stabilnost biblioteka pripremljenih uz TSO Comprehensive (EU) analizu procenjena je pomoću 8 FFPE DNK i 8 FFPE RNK uzoraka iz 9 različitih tipova tkiva testiranih u triplikatu kroz analizu. Biblioteke iz PCR ploče normalizovane biblioteke (NL) su objedinjene i sekvencirane 0. dana. Preostala zapremina biblioteka u NL PCR ploči uskladištena je zamrznuta (-25°C do -15°C), a zatim je ponovo objedinjena i sekvencirana 30. dana. Svi statistički značajni rezultati za male DNK varijante između 0. i 30. dana bili su tehnički zanemarljivi. Nije bilo statističkih razlika između rezultata 0. i 30. dana za MSI status, TMB rezultat, amplifikacije gena, RNK fuzije i varijante RNK spajanja. Podaci ukazuju na to da su biblioteke generisane iz TSO Comprehensive (EU) analize stabilne do 30 dana na -25°C do -15°C .

Stabilnosti FFPE tkiva na preparatu

Stabilnost FFPE tkiva na preparatu za upotrebu sa TSO Comprehensive (EU) analizom procenjena je seciranjem FFPE blokova (isečci od $5\ \mu\text{m}$) iz 16 jedinstvenih uzoraka koji predstavljaju 9 tipova tkiva, koji se postavljaju na preparate, nakon čega sledi skladištenje na sobnoj temperaturi u 3 vremenske tačke: 1. dan (kontrola), 4 nedelje i 8 nedelja. Nukleinske kiseline (i DNK i RNK) ekstrahovane su u navedenoj vremenskoj tački, a zatim uskladištene zamrznute, dok se ne završe ekstrakcije za sve vremenske tačke. Ekstrahovana RNK je uskladištena na -65°C do -85°C , a ekstrahovana DNK je uskladištena na -25°C do -15°C . Za svaku vremensku tačku, testirana su tri replikata po uzorku pomoću TSO Comprehensive (EU) analize i upoređena sa kontrolom za male DNK varijante, MSI status, TMB rezultat, amplifikacije gena, RNK fuzije i RNK varijante spajanja. Podaci ukazuju na to da su FFPE tkiva na preparatu za upotrebu sa TSO Comprehensive (EU) analizom stabilna do 4 nedelje.

Zaštitno vezivanje za ulaznu titraciju nukleinske kiseline

Unos nukleinske kiseline za TSO Comprehensive (EU) analizu procenjen je testiranjem DNK iz 33 FFPE uzorka koji obuhvataju 17 tipova tkiva, sa ulaznim nivoima u rasponu od 10 ng do 500 ng i testiranjem RNK iz 5 FFPE uzoraka iz 5 tipova tkiva sa ulaznim nivoima u rasponu od 10 ng do 85 ng. Procenjeni su pokazatelji kontrole kvaliteta biblioteke i zavisili su od uzorka. DNK rezultati su pokazali da neki, ali ne i svi pokazatelji kontrole kvaliteta DNK uzorka reaguju na povećan unos iznad nominalnog unosa od 40 ng:

- MEDIAN_INSERT_SIZE nije odgovorila na unos iznad 30 ng.
- MEDIAN_EXON_COVERAGE je pokazala pozitivnu korelaciju sa povećanjem unosa.
- PCT_EXON_50X se povećao sa povećanjem unosa do 80 ng.
- USABLE_MSI_SITES su se povećale sa povećanjem unosa. Neki uzorci sa manje od 40 USABLE_MSI_SITES pri 40 ng, ispunili su specifikaciju pri većim unosima, što bi omogućilo izračunavanje MSI rezultata.
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET je povećan sa povećanjem unosa.

- Povećanje unosa za povećanje COVERAGE_MAD prema navedenoj gornjoj granici.

Pokazatelj kontrole kvaliteta RNK uzorka povećan (MEDIAN_INSERT_SIZE i TOTAL_ON_TARGET_READS) ili smanjen (MEDIAN_CV_GENE_500X) sa 10 ng na 40 ng, ali generalno se nije promenio između unosa od 40 ng i 85 ng.

Granica praznog uzorka

Procenat lažno pozitivnih rezultata (od ukupno očekivanih negativnih) procenjen testiranjem replikata FFPE normalnog ili benignog susednog tkiva, koje ne bi trebalo da sadrži somatske varijante za male DNK varijante, amplifikacije gena, MSI, RNK fuzije i RNK varijante spajanja. Lažno pozitivni rezultati nisu analizirani za TMB jer nema kliničkog preseka. Šest DNK i 6 RNK FFPE uzoraka je analizirano u duplikatu od strane 2 operatera tokom 3 dana za svaku od 2 serije reagenasa. Podskup uzoraka je ponovo objedinjen i ponovo sekvenciran samo u 3x DNK i samo u 3x RNK formatu, za procenu lažno pozitivnih rezultata sa nekoliko višestrukih konfiguracija podržanih ovim uređajem. Pored toga, bilo je 30 dodatnih ciklusa RNK uzoraka u duplikatu koji su obrađeni sa 1 serijom reagenasa, podeljenih između 2 operatera. Ukupno, bilo je 168 mogućih opservacija za DNK i 228 opservacija za RNK umanjene nevažecim bibliotekama za svaki tip varijante. Procenat lažno pozitivnih rezultata izračunat je na nivou gena za amplifikacije i na nivou pozicije (približno 1,9 miliona pozicija) za male DNK varijante. Procenat lažno pozitivnih rezultata za DNK tipove varijanti prikazan je u [Tabela 45](#). Procenat lažno pozitivnih rezultata za RNK fuzije i varijante spajanja bio je 0%, kao što je prikazano u [Tabela 46](#).

Tabela 45 Lažno pozitivni rezultati po DNK tipu varijante

Tip varijante	Lažno pozitivno
Amplifikacije gena	0% (0/9912)
Male DNK varijante	0,0001% (271/295.801.567)
MSI	0% (0/156)
TMB	N/P*

* Lažno pozitivni rezultati nisu primenljivi jer se TMB prijavljuje kao rezultat i nema kvalitativni ishod.

Tabela 46 Lažno pozitivni rezultati po RNK tipu varijante

Tip varijante	Lažno pozitivno
Fuzija	0% (0/226)
Varijanta spajanja	0% (0/226)

Granica detekcije

Sprovedene su dve studije da bi se procenila granica detekcije za TSO Comprehensive (EU). Studija 1 je procenila RET male DNK varijante, RET fuzije i NTRK1 – 3 fuzije. Studija 2 je procenila druge varijante profilisanja tumora.

Studija 1

Utvrđene su granice detekcije (LoD) za NTRK1, NTRK3 i RET male DNK varijante i NTRK1 – 3 i RET fuzije. LoD je najniža vrednost analita (na primer, učestalost varijante alela ili prateća očitavanja) koja se može dosledno detektovati (granica detekcije od 95% ili greška tipa II od 5%). U studiji su korišćena FFPE tkiva sa RET malim DNK varijantama (medularni karcinom tireoidne žlezde), RET fuzije (papilarni karcinom tireoidne žlezde, atipični Spitz tumor) i NTRK1 – 3 fuzije (gliom niskog stepena diferencijacije, glioblastoma multiforme, miofibroblastni sarkom, sarkom, sekretorni karcinom dojke, karcinom debelog creva), kao i FFPE tretirana ćelijska linija sa NTRK1 i NTRK3 male DNK varijante. Svaki uzorak je razblažen na najmanje 5 nivoa (u opsegu od približno 0,01 - 0,10 VAF za male DNK varijante i 2 - 25 za prateća očitavanja za fuzije). Bilo je 18 opservacija za svaki nivo testa, po seriji, po varijanti, koje su generisala 3 operatera i 3 instrumenta za sekvenciranje, koji su inicirali pripremu biblioteke u 3 neuzastopna dana sa 2 replikata uzorka svakog nivoa testa. Testirane su dve serije reagenasa.

Za DNK varijante, 2 serije su analizirane nezavisno pomoću probit regresije ili pristupa stope pogodaka (najniži nivo testa sa stopom pogodaka (procena tačke) $\geq 95\%$) da bi se utvrdila LoD za svaku varijantu po seriji. Veća LoD u okviru dve serije reagenasa uzeta je kao granica detekcije za varijantu ([Tabela 47](#)).

Za RNK fuzije, FFPE ćelijske linije su korišćene za procenu vrednosti LoD za svaki fuzioni gen. LoD su zatim potvrđene sa FFPE tkivima pomoću duplih preparata biblioteke putem 3 operatera, 3 instrumenta i 3 serije reagenasa, kako bi se generisalo 54 opservacije po varijanti u blizini LoD, utvrđene pomoću FFPE ćelijskih linija. Navedene granice detekcije za svaku fuziju ([Tabela 48](#)) su najniža srednja vrednost pratećih očitavanja koja je dostigla stopu pogodaka (procena tačke) $\geq 95\%$.

Tabela 47 Granica detekcije za NTRK1, NTRK3 i RET male DNK varijante

Marker	Chr	Položaj	Referenca	Alternativa	Granica detekcije (Učestalost varijanti alela)
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

Marker	Chr	Položaj	Referenca	Alternativa	Granica detekcije (Učestalost varijanti alela)
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (delecija)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

Chr = hromozom

* Ove DNK varijante su analizirane probit regresijom; ostale DNK varijante analizirane su pristupom stope pogotka.

Tabela 48 Granica detekcije za NTRK i RET fuzije

Gen	Fuzija	Granica detekcije (Prateća očitavanja)
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

Studija 2

Procenjene su granice detekcije (LoD) varijanti profilisanja tumora, prijavljene od strane TSO Comprehensive (EU). LoD je najniža vrednost analita (na primer, učestalost varijante alela, promena preklapanja ili prateća očitavanja) koja se može dosledno detektovati (stopa pogotka od 95% ili greška tipa II od 5%). FFPE uzorci iz 17 tipova tkiva koji sadrže varijante, razblaženi su na više nivoa testa. Šest opservacija je generisano po nivou od strane dva operatera, svaki koristeći drugačiju seriju reagenasa i instrument.

DNK varijante

LoD 10 klasa malih DNK varijanti (ukupno 25 varijanti) i 2 DNK amplifikacije gena (ERBB2 i MET) određene su i sumirane kao opsezi (Tabela 49). Takođe su uključene RET varijante iz 1. studije LoD. Dve od 3 insercije veće od 5 bp imale su LoD od 0,034 i 0,036 VAF, pri čemu je treća imala LoD od 0,215 VAF. Ovo poslednje je bila

insercija u regionu niske kompleksnosti, gde insercija dodaje dodatna ponavljanja, utiče na poravnanje i zahteva više očitavanja radi konzistentne detekcije. Stoga, neki genomske konteksti niske kompleksnosti mogu uticati na detekciju insercija > 5bp.

Tabela 49 Granica detekcije malih DNK varijanti i amplifikacija gena

Tip (jedinica mere za LoD)	Klasa varijantne / Genomski kontekst	Broj varijanti	Opseg
Male DNK varijante (učestalost varijanti alela)	SNV	5	0,016–0,064
	MNV	3	0,022–0,048
	Insercija (1-2bp) se ponavlja u blizini homopolimera	2	0,086–0,104
	Insercija (1-2bp) se ponavlja u blizini dinukleotida	2	0,038–0,051
	Insercija (3-5bp)	2	0,030–0,056
	Insercija (> 5bp i do 25bp)	3	0,034–0,215
	Delecija (1-2bp) se ponavlja u blizini homopolimera	2	0,094–0,100
	Delecija (1-2bp) se ponavlja u blizini dinukleotida	2	0,033–0,070
	Delecija (3-5bp)	2	0,028–0,064
	Delecija (> 5 i do 25bp)	2	0,047–0,055
Amplifikacija gena (promena preklapanja)	Po genu (ERBB2, MET)	2	2,034–2,195

Fuzije

LoD su određene za 18 fuzija, što obuhvata 20 gena u TSO Comprehensive (EU) panelu, koji su se kretali od 10 do 54,7 pratećih očitavanja (Tabela 50). Dodatna 3 gena (NTRK1 – 3) testirana su u drugoj studiji. RET gen je testiran ovde i u drugoj LoD studiji. Šesnaest fuzija sa utvrđenim LoD imalo je podatke u skladu sa zajedničkom LoD od 16 pratećih očitavanja koristeći dvostranu gornju granicu poverenja od 95% (UCL). Dve fuzije su imale LoD od 24,7 i 44,2 prateća očitavanja koja nisu bila u skladu sa zajedničkom LoD.

Fuzija FGFR2-SRPK2 sa vrednošću LoD od 24,7 pratećih očitavanja imala je regione ponovnog preklapanja u tački prekida, kao što je navedeno u softveru TSO Comprehensive (EU) analize. Ponavljajući regioni u okviru tačke prekida obično imaju niže nivoe dokaza jer očitavanje može da se mapira negde drugde u genomu ili može

da ostane nerazvrstano. Pored toga, ponavljani regioni čine proces sklapanja (koji se koristi za identifikaciju fuzionih sekvenci) izazovnijim i zahtevaju dodatne dokaze za konstrukciju tačne sekvence. SEPT14-EGFR je još jedan primer fuzije sa homolognom sekvencom u tački prekida.

Fuzija BCL2-IGHJ5 sa vrednošću LoD od 44,2 prateća očitavanja imala je veoma kratak gen (IGHJ5) sa tačkom prekida blizu početka egzona koji zahteva kratka poravnanja prazninama. Zbog toga je potrebno više očitavanja za konzistentnu detekciju.

Tabela 50 Granica detekcije za fuzije

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

Varijante spajanja

2 varijante RNK spajanja, MET i EGFR, imale su LoD od 18,7, odnosno 24,8 pratećih očitavanja.

Sadržaj tumora

Rezultati u studiji daju preporuke za sadržaj tumora za kliničke uzorke. Uopšteno govoreći, što je veći sadržaj tumora, to je veći „signal“ (VAF, promena preklapanja ili prateća očitavanja) za varijante u tumoru. Preporuke o minimalnom sadržaju tumora zasnivaju se na sledećim opservacijama. Vrednosti LoD za male DNK varijante nisu

veće od 0,104 VAF (sa izuzetkom TP53 insercije). Da bi se detektovale pokretačke mutacije u tumoru (učestalost varijante alela 0,50), preporučuje se sadržaj tumora od 20%, tako da bi ove mutacije imale 0,10 VAF i bile na ili iznad LoD. Pri sadržaju tumora od 20%, geni amplifikovani do 5,5 puta promene preklapanja (11 kopija), dosledno bi se detektovali na osnovu granice detekcije promene preklapanja od 1,8 puta. Pri sadržaju tumora od 20%, fuzije sa 80 pratećih očitavanja, dosledno bi se detektovale na osnovu granice detekcije od 16 pratećih očitavanja.

Ponovljivost

Sprovedene su dve studije za procenu ponovljivosti za TSO Comprehensive (EU) analizu. Studija 1 je procenila RET male DNK varijante pored NTRK i RET varijanti fuzije. Studija 2 je procenila dodatne varijante profilisanja tumora.

Studija 1

Ova studija je obavljena da bi se procenila ponovljivost TSO Comprehensive (EU) analize u 3 centra za testiranje (1 interni, 2 eksterna) od strane 2 operatera po centru, pomoću 2 replikata u okviru analize i tokom 3 dana neuzastopna dana testiranja. Testiranje je sprovedeno sa panelom ponovljivosti, uključujući DNK uzorke koji sadrže specifične poznate RET male DNK varijante i RNK uzorke koji sadrže specifične poznate NTRK1 – 3 i RET varijante fuzije iz uzoraka tkiva i ćelijskih linija fiksiranih formalinom, ugrađenih u parafinu (FFPE). Panel je sadržao DNK i RNK članove panela sa niskim nivoima varijanti i visokim nivoima varijanti sa istim brojem članova panela niskog i visokog nivoa za svaku klasu varijante. Članovi panela visokog nivoa bili su ciljani približno pri LoD 2 do 3 puta, dok su članovi panela niskog nivoa bili ciljani pri približnoj LoD. U svakom centru, svaki operater je testirao članove panela u duplikatu 3 puta, generišući 6 opservacija po cilju, po članu panela. Od sva 3 centra generisano je 36 opservacija po članu panela (3 centra/instrumenta × 2 operatera × 2 replikata u okviru analize × 3 startna dana).

Procenat pozitivnih pozivanja (PPC) i procenat negativnih pozivanja (PNC) za ciljane male DNK varijante i ciljane RNK varijante fuzije na visokom nivou, određeni su kao primarne krajnje tačke. PPC i PNC za ciljane male DNK varijante i ciljane RNK varijante fuzije na niskom nivou, izračunati su kao sekundarne krajnje tačke. Dvostrani intervali pouzdanosti (CI) od 95%, povezani sa svim krajnjim tačkama, izračunati su metodom Vilsonovog rezultata. Primarne analize su obavljene da bi se procenili PPC i PNC (sa povezanim CI od 95%) u ciljanim članovima panela na visokom nivou, kombinovanjem TSO Comprehensive (EU) opservacija analize za dati cilj u grupi članova panela, koji predstavljaju odgovarajuću klasu varijante (na primer, male DNK varijante i RNK fuzije) u centrima/na instrumentima, među operaterima i ciklusima. Za svaku ciljanu varijantu, opservacije TSO Comprehensive (EU) analize kod drugih članova panela na visokom nivou, ciljane za isti tip varijante, ali koje ne sadrže istu varijantu određenu pravilom većine, kombinovane su sa izračunatim PNC. Ukupni PPC i PNC za članove ciljanog panela niskog nivoa određeni su na sličan način.

RET male DNK varijante

Za članove panela malih DNK varijanti visokog nivoa, ukupni PPC je bio 100,0% (207/207; 95% CI: 98,2% do 100,0%) (Tabela 51). Ukupan PNC za članove panela malih DNK varijanti visokog nivoa je bio 100,0% (1035/1035; 95% CI: 99,6% do 100,0%) (Tabela 52). Za članove panela malih DNK varijantnih niskog nivoa, ukupan PPC za ciljane članove panela malih DNK varijantnih niskog nivoa bio je 99,1% (210/212; 95% CI: 96,6% do 99,7%), a ukupni PNC je bio 100,0% (1026/1026; 95% CI: 99,6% do 100,0%).

Tabela 51 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju RET malih DNK varijanti kod članova ciljanog panela visokog i niskog nivoa

Nivo varijante	Tip varijante	Ciljna varijanta (Nukleotid)	Ciljna varijanta (Aminokiselina)	n	Srednja VAF	Procenat pozitivnih pozivanja (%)	95% CI*
Visok	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0% (34/34)	(89,8%, 100,0%)
Visok	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Visok	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0% (33/33)	(89,6%, 100,0%)
Visok	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Visok	Delecija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0% (33/33)	(89,6%, 100,0%)
Visok	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Visok	Sve male DNK varijante su visoke	Sve male DNK varijante su visoke	Sve male DNK varijante su visoke	207	N/P	100,0% (207/207)	(98,2%, 100,0%)

Nivo varijante	Tip varijante	Ciljna varijanta (Nukleotid)	Ciljna varijanta (Aminokiselina)	n	Srednja VAF	Procenat pozitivnih pozivanja (%)	95% CI*
Nizak	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Nizak	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3% (33/35)	(81,4%, 98,4%)
Nizak	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Nizak	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Nizak	Delecija	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0,065	100,0% (34/34)	(89,8%, 100,0%)
Nizak	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Nizak	Sve male DNK varijante su niske	Sve male DNK varijante su niske	Sve male DNK varijante su niske	212	N/P	99,1% (210/212)	(96,6%, 99,7%)

Skraćenice: N/A, nije primenljivo; VAF, učestalost varijante alela.

* Dvostrani interval pouzdanosti od 95% izračunat metodom Vilsonovog rezultata.

Tabela 52 PNC TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju RET malih DNK varijanti kod članova ciljanog panela visokog i niskog nivoa

Nivo varijante	Tip varijante	Ciljna varijanta (Nukleotid)	Ciljna varijanta (Aminokiselina)	n ¹	Procenat negativnih pozivanja (%)	95% CI ²
Visok	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0% (173/173)	(97,8%, 100,0%)
Visok	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0% (171/171)	(97,8%, 100,0%)
Visok	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0% (174/174)	(97,8%, 100,0%)
Visok	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0% (172/172)	(97,8%, 100,0%)
Visok	Delecija	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0% (174/174)	(97,8%, 100,0%)
Visok	Insercija	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0% (171/171)	(97,8%, 100,0%)
Visok	Sve male DNK varijante su visoke	Sve male DNK varijante su visoke	Sve male DNK varijante su visoke	1035	100,0% (1035/1035)	(99,6%, 100,0%)
Nizak	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0% (177/177)	(97,9%, 100,0%)
Nizak	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0% (143/143)	(97,4%, 100,0%)
Nizak	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)

Nivo varijante	Tip varijante	Ciljna varijanta (Nukleotid)	Ciljna varijanta (Aminokiselina)	n ¹	Procenat negativnih pozivanja (%)	95% CI ²
Nizak	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Nizak	Delecija	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100,0% (178/178)	(97,9%, 100,0%)
Nizak	Insercija	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100,0% (176/176)	(97,9%, 100,0%)
Nizak	Sve male DNK varijante su niske	Sve male DNK varijante su niske	Sve male DNK varijante su niske	1026	100,0% (1026/1026)	(99,6%, 100,0%)

¹ Sve opservacije objedinjene iz kombinacija člana-varijante panela za koje je većina pozivanja negativna, tj. ciljane varijante koje sadrže fuzije sa manje od 50% pozitivnih pozivanja.

² Dvostrani interval pouzdanosti od 95% izračunat metodom Vilsonovog rezultata.

Tabela 53 prikazuje analizu komponenti varijanse učestalosti varijanti alela (VAF) u približno 36 opservacija za svakog člana panela. Standardna devijacija (SD) i procenat koeficijenta varijacije (%CV; ukupno i za svaki izvor) izračunati su i predstavljeni za svaku ciljanu RET malu DNK varijantu.

Tabela 53 TSO Comprehensive (EU) Analiza komponenti varijanse analize VAF u ciljanim članovima panela malih DNK varijanti

Nivo varijante	Tip varijante	Ciljna varijanta (Nukleotid)	Ciljna varijanta (Aminokiselina)	n	Srednja VAF	SD (%CV centra)	Operativna SD (%CV)	SD dana (%CV)	SD replikata (%CV)	Ukupna SD (%CV)
Visok	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	0,011 (7,2%)	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,017 (10,8%)	0,020 (13,0%)
Visok	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	0,006 (4,6%)	0,000 (0,0%)	0,005 (3,7%)	0,014 (10,2%)	0,017 (11,8%)
Visok	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	0,005 (4,1%)	0,000 (0,0%)	0,002 (1,7%)	0,012 (10,7%)	0,013 (11,6%)
Visok	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,009 (4,4%)	0,012 (6,0%)	0,015 (7,5%)
Visok	Delecija	chr10_43615611_GAGATGTTTATG_A_G	RET D898_E901del	33	0,199	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,011 (5,5%)	0,017 (8,6%)	0,020 (10,2%)
Visok	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	0,003 (3,0%)	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,009 (9,6%)	0,010 (10,1%)
Nizak	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,009 (22,2%)	0,009 (22,2%)
Nizak	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	0,000 (0,0%)	0,003 (9,8%)	0,002 (6,2%)	0,007 (21,7%)	0,008 (24,6%)

Nivo varijante	Tip varijante	Ciljna varijanta (Nukleotid)	Ciljna varijanta (Aminokiselina)	n	Srednja VAF	SD (%CV centra)	Operativna SD (%CV)	SD dana (%CV)	SD replikata (%CV)	Ukupna SD (%CV)
Nizak	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	0,003 (6,0%)	0,000 (0,0%)	0,000 (0,0%)	0,008 (17,5%)	0,008 (18,5%)
Nizak	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0,071	0,000 (0,0%)	0,008 (10,7%)	0,000 (0,0%)	0,011 (14,9%)	0,013 (18,4%)
Nizak	Delecija	chr10_43615611_GAGATGTTTATG_A_G	RET D898_E901del	34	0,065	0,002 (2,5%)	0,006 (9,9%)	0,004 (6,4%)	0,010 (16,2%)	0,013 (20,2%)
Nizak	Insercija	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,037	0,005 (13,8%)	0,000 (0,0%)	0,003 (9,1%)	0,006 (15,9%)	0,008 (22,9%)

NTRK 1 – 3 i RET fuzije

Za članove RNK fuzionog panela visokog nivoa, ukupan PPC je bio 99,3% (285/287; 95% CI: 97,5% do 99,8%) (Tabela 54). PPC je bio 100% za svakog člana panela visokog nivoa, osim za člana panela BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4% [34/36; 95% CI: 81,9% do 98,5%]). Ukupan PNC za članove RNK fuzionog panela visokog nivoa je bio 100,0% (1724/1724; 95% CI: 99,8% do 100,0%) (Tabela 55). Za članove ciljanog RNK fuzionog panela niskog nivoa, ukupni PPC je bio 95,4% (272/285; 95% CI: 92,3%, 97,3%), a ukupni PNC je bio 100,0% (1851/1851; 95% CI: 99,8% do 100,0%).

Tabela 54 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju NTRK i RET fuzija kod članova ciljanog panela visokog i niskog nivoa

Nivo varijante	Ciljna fuzija	n	Srednja vrednost pratećih očitavanja	Procenat pozitivnih pozivanja (%)	95% CI*
Visok	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Visok	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4% (34/36)	(81,9%, 98,5%)
Visok	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Visok	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Visok	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Visok	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0% (35/35)	(90,1%, 100,0%)
Visok	NCOA4-RET	36	36,7	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Visok	CCDC6-RET	36	33,4	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Visok	Sve fuzije su visoke	287	36,5	99,3% (285/287)	(97,5%, 99,8%)
Nizak	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4% (34/36)	(81,9%, 98,5%)
Nizak	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6% (29/36)	(65,0%, 90,2%)

Nivo varijante	Ciljna fuzija	n	Srednja vrednost pratećih očitavanja	Procenat pozitivnih pozivanja (%)	95% CI*
Nizak	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3% (33/35)	(81,4%, 98,4%)
Nizak	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Nizak	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Nizak	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
Nizak	NCOA4-RET	36	15,8	97,2% (35/36)	(85,8%, 99,5%)
Nizak	KIF5B-RET	34	16,6	97,1% (33/34)	(85,1%, 99,5%)
Nizak	Sve fuzije su niske	285	16,8	95,4% (272/285)	(92,3%, 97,3%)

* Dvostrani interval pouzdanosti (CI) od 95% izračunat metodom Vilsonovog rezultata.

Tabela 55 PNC TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju NTRK i RET fuzija kod članova neciljanog panela visokog i niskog nivoa

Nivo varijante	Ciljne fuzije	n ¹	Procenat negativnih pozivanja (%)	95% CI ²
Visok	LMNA-NTRK1	180	100,0% (180/180)	(97,9%, 100,0%)
Visok	BCAN-NTRK1	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Visok	ETV6-NTRK2	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Visok	TRIM24-NTRK2	216	100,0% (216/216)	(98,2%, 100,0%)
Visok	ETV6-NTRK3	144	100,0% (144/144)	(97,4%, 100,0%)
Visok	BTBD1-NTRK3	216	100,0% (216/216)	(98,2%, 100,0%)
Visok	NCOA4-RET	215	100,0% (215/215)	(98,2%, 100,0%)
Visok	CCDC6-RET	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Visok	Sve fuzije - visoko	1724	100,0% (1724/1724)	(99,8%, 100,0%)
Nizak	LMNA-NTRK1	213	100,0% (213/213)	(98,2%, 100,0%)
Nizak	BCAN-NTRK1	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Nizak	ETV6-NTRK2	250	100,0% (250/250)	(98,5%, 100,0%)
Nizak	STRN-NTRK2	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)

Nivo varijante	Ciljne fuzije	n ¹	Procenat negativnih pozivanja (%)	95% CI ²
Nizak	ETV6-NTRK3	177	100,0% (177/177)	(97,9%, 100,0%)
Nizak	BTBD1-NTRK3	249	100,0% (249/249)	(98,5%, 100,0%)
Nizak	NCOA4-RET	213	100,0% (213/213)	(98,2%, 100,0%)
Nizak	KIF5B-RET	251	100,0% (251/251)	(98,5%, 100,0%)
Nizak	Sve fuzije - niske	1851	100,0% (1851/1851)	(99,8%, 100,0%)

¹ Sve opservacije objedinjene iz kombinacija člana-varijante panela za koje je većina pozivanja negativna, tj. cilijane varijante koje sadrže fuzije sa manje od 50% pozitivnih pozivanja.

² Dvostrani interval pouzdanosti (CI) od 95% izračunat metodom Vilsonovog rezultata.

Tabela 56 prikazuje analizu komponenti varijanse pratećih očitavanja u približno 36 opservacija unutar svake cilijane fuzije. SD i %CV (ukupno i za svaki izvor) su izračunati i predstavljeni za svaku ciljanu fuziju.

Tabela 56 TSO Comprehensive (EU) Analiza komponenti varijanse analize za podršku očitavanja u članovima ciljanog panela za RNK fuziju

Nivo varijante	Fuzija	n	Srednja vrednost pratećih očitavanja	SD centra (%CV)	SD operatera (%CV)	SD dana (%CV)	SD replikata (%CV)	Ukupna SD (%CV)
Visok	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9%)	3,37 (9%)	6,93 (18%)	9,04 (24%)	12,39 (33%)
Visok	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41%)	7,87 (23%)	5,40 (16%)	8,95 (27%)	18,98 (57%)
Visok	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33%)	3,50 (14%)	4,20 (17%)	4,86 (20%)	10,86 (44%)
Visok	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31%)	4,24 (12%)	6,82 (19%)	6,87 (19%)	15,57 (43%)
Visok	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20%)	10,20 (18%)	9,25 (16%)	8,69 (15%)	19,93 (35%)
Visok	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5%)	2,65 (8%)	2,16 (7%)	10,47 (32%)	11,11 (34%)
Visok	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13%)	4,09 (11%)	6,17 (17%)	5,20 (14%)	10,17 (28%)
Visok	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22%)	2,56 (8%)	6,53 (20%)	5,51 (16%)	11,49 (34%)
Nizak	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13%)	0,00 (0%)	2,74 (20%)	4,37 (32%)	5,47 (40%)

Nivo varijante	Fuzija	n	Srednja vrednost pratećih očitavanja	SD centra (%CV)	SD operatera (%CV)	SD dana (%CV)	SD replikata (%CV)	Ukupna SD (%CV)
Nizak	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17%)	2,98 (18%)	4,61 (27%)	5,82 (34%)	8,52 (50%)
Nizak	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0%)	3,41 (22%)	3,83 (25%)	4,39 (29%)	6,75 (45%)
Nizak	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13%)	0,61 (5%)	2,33 (17%)	2,57 (19%)	3,95 (29%)
Nizak	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24%)	3,46 (14%)	0,00 (0%)	6,39 (26%)	9,44 (38%)
Nizak	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5%)	0,00 (0%)	0,00 (0%)	6,64 (37%)	6,71 (37%)
Nizak	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13%)	1,03 (7%)	0,00 (0%)	5,11 (32%)	5,61 (36%)
Nizak	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12%)	0,00 (0%)	1,58 (10%)	5,83 (35%)	6,39 (39%)

%CV: Procenat koeficijenta varijacije.

SD: Standardna devijacija.

Studija 2

Druga studija je obavljena da bi se procenila ponovljivost TSO Comprehensive (EU) analize u 3 centra za testiranje (2 eksterna i 1 interni), od strane 2 operatera/instrumenta po centru, pomoću 3 jedinstvene serije reagenasa, u toku 4 dana za testiranje (neuzastopna) i pomoću 2 ciklusa sekvenciranja po biblioteci uzorka.

Testiranje je sprovedeno pomoću ekstrahovanih DNK i RNK uzoraka iz 41 FFPE uzorka tkiva i 1 FFPE ćelijske linije (sa 1 FFPE uzorkom tkiva i FFPE ćelijskom linijom koje se koriste za kreiranje po 2 člana panela). Uzorci tkiva su se sastojali od sledećih tipova: mokraćna bešika, kost, mozak, dojka, debelo crevo, jejunum, bubreg, jetra, pluća, jajnik, prostata, koža, meko tkiv, želudac, tireoidna žlezda i materica. Testirano je ukupno 44 člana panela, uključujući DNK članove panela sa malim DNK varijantama (SNV, MNV, insercije i delecije), amplifikacije gena, različite TMB rezultate, visoke MSI rezultate i RNK članove panela sa fuzijama gena i varijantama spajanja. Većina članova panela imala je poznate ciljane varijante na nivoima od približno 2 do 3 puta većim od granice detekcije specifične za varijantu (~2–3×LoD).

LOD je koncentracija analita gde su uočeni rezultati analize pozitivni (varijanta detektovana u odnosu na TSO Comprehensive (EU) presek analize) ≥ 95% vremena. Srednja uočena vrednost nivoa varijante bila je kategorisana kao približno <2×LOD (uočeni nivoi varijante pri 1,5×LOD), ~2–3×LOD (uočeni nivoi varijante pri 1,5×LOD do 3,4×LOD) i približno 3×LOD (uočeni nivoi varijante pri > 3,4×LOD).

Procenat pozitivnih pozivanja (PPC) za male DNK varijante, amplifikacije gena, MSI-visoke (MSI-H) i RNK varijante izračunati su kombinovanjem opservacija u ciklusima sekvenciranja i centrima. Procentualna negativna pozivanja (PNC) su slično izračunata za male DNK varijante, amplifikacije gena i RNK varijante. Za svaku poznatu ciljnu varijantu, opservacije TSO Comprehensive (EU) analize u članovima panela istog tipa varijante, ali koji sadrže druge varijante, koje nisu izvedene iz istog izvora uzorka, niti ispunjavaju pravilo većine za tu varijantu (tj. < 50% pozivanja je bilo pozitivno), kombinovane su u centrima, sa operaterima/instrumentima, danima, serijama reagenasa i ciklusima sekvenciranja za izračunavanje PNC. Dvostrani intervali pouzdanosti (CI) od 95% izračunati su metodom Vilsonovog rezultata.

Male DNK varijante

Tabela 57 prikazuje PPC za ciljane male DNK varijante. PPC su se kretali od 91,3% za BRAF SNV do 100% za većinu malih DNK varijanti.

Tabela 57 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju malih DNK varijanti kod članova kombinovanog ciljanog panela

Uočeni nivo varijante ¹	Tip varijante	Ciljana varijanta (nukleotid)	Ciljana varijanta (aminokiselina)	Srednja vrednost VAF ²	Procenat pozitivnog pozivanja (%)	95% CI ³
~2- 3xLOD	DELECIJA	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0% (28/28)	(87,9%, 100,0%)
~2- 3xLOD	DELECIJA	chr5_112175675_AAG_ A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0% (40/40)	(91,2%, 100,0%)
~2- 3xLOD	INSERCIJA	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0% (32/32)	(89,3%, 100,0%)
~2- 3xLOD	INSERCIJA	chr5_112175675_A_ AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	INSERCIJA	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0% (4/4)	(51,0%, 100,0%)
~2- 3xLOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3% (42/46)	(79,7%, 96,6%)
~2- 3xLOD	DELECIJA	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGC A_G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2- 3xLOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0% (38/38)	(90,8%, 100,0%)
~2- 3xLOD	DELECIJA	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0% (44/44)	(92,0%, 100,0%)

Uočeni nivo varijante ¹	Tip varijante	Ciljana varijanta (nukleotid)	Ciljana varijanta (aminokiselina)	Srednja vrednost VAF ²	Procenat pozitivnog pozivanja (%)	95% CI ³
~2-3xLOD	INSERCIJA	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0,075	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
~2-3xLOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0% (36/36)	(90,4%, 100,0%)
~2-3xLOD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0% (38/38)	(90,8%, 100,0%)
~2-3xLOD	INSERCIJA	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	DELECIJA	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0% (44/44)	(92,0%, 100,0%)
<2xLOD	INSERCIJA	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0,157	100,0% (2/2)	(34,2%, 100,0%)
~2-3xLOD	INSERCIJA	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)

¹ Nivo varijante izračunat iz srednje uočene učestalosti varijanti alela.

² Srednja učestalost varijanti alela izračunata iz uočenih rezultata analize.

³ Dvostrani interval pouzdanosti od 95% izračunat metodom Vilsonovog rezultata.

PNC su bili 100% u malim DNK varijantama.

Tabela 58 prikazuje rezultate analize varijanse komponenti za VAF za svaki izvor varijacije i ukupnu varijaciju u svim članovima panela sa ciljanim malim DNK varijantama.

Tabela 58 Analiza komponenti varijanse za VAF za ciljane male DNK varijante

Ciljna varijanta	N	Srednja VAF	SD centra (%CV)	SD operatera (centar) (%CV)	SD dana (centar, operater) (%CV)	SD serije (%CV)	SD analize (%CV)	Ukupna SD (%CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)

Ciljna varijanta	N	Srednja VAF	SD centra (%CV)	SD operatera (centar) (%CV)	SD dana (centar, operater) (%CV)	SD serije (%CV)	SD analize (%CV)	Ukupna SD (%CV)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_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)

Postojale su dve male DNK ciljane varijante za koje je broj opservacija bio premali da bi se model komponenti varijanse mogao uklopiti. Za ove dve ciljane varijante, ukupne SD su bile 0,027 za varijantu chr1_27024001_C_CG i 0,001 za varijantu chr17_7578470_C_CGGGCGG.

Amplifikacije gena

Tabela 59 prikazuje PPC za ciljane amplifikacije gena. PPC je bio 100,0% za MET i 100,0% za ERBB2.

Tabela 59 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju amplifikacije gena kod članova kombinovanog ciljanog panela

Uočeni nivo varijante ¹	Ciljna varijanta	Srednja vrednost uočene promene preklapanja ²	Procenat pozitivnog pozivanja (%)	95% CI ³
~2-3xLOD	MET	5,14	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	ERBB2	2,33	100,0% (47/47)	(92,4%, 100,0%)

¹ Nivo varijacije izračunat iz srednje uočene promene preklapanja.

² Srednja promena preklapanja izračunata iz uočenih rezultata testa.

³ Dvostrani interval pouzdanosti od 95% izračunat metodom Vilsonovog rezultata.

PNC su bili 100% u amplifikacijama gena.

Tabela 60 prikazuje rezultate analize varijanse komponenti o promenama preklapanja za svaki izvor varijacije i ukupnu varijaciju u svim članovima panela sa ciljanim amplifikacijama gena.

Tabela 60 Analiza komponenti varijanse o promeni preklapanja za ciljane amplifikacije gena

Ciljna varijanta	N	Srednja vrednost promene preklapanja	SD centra (%CV)	SD operatera (centar) (%CV)	SD dana (centar, operater) (%CV)	SD serije (%CV)	SD analize (%CV)	Ukupna SD (%CV)
ERBB2	47	2,33	0,02 (0,6)	0,01 (0,4)	0,02 (0,9)	0,01 (0,4)	0,01 (0,5)	0,03 (1,3)
MET	48	5,14	0,05 (1,0)	0,12 (2,4)	0,14 (2,6)	0,00 (0,0)	0,03 (0,6)	0,19 (3,7)

MSI

Tabela 61 prikazuje PPC za ciljane MSI-H članove panela. PPC su bili 100% za oba MSI-H člana panela.

Tabela 61 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju MSI-H statusa kod članova kombinovanog ciljanog panela

Član panela	Srednja vrednost MSI rezultata ¹	N	Procenat pozitivnog pozivanja (%)	95% 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%)
Svi članovi		68	100,0% (68/68)	(94,7%, 100,0%)

¹ Srednji uočeni MSI rezultat izračunat iz uočenih rezultata analize.

² Dvostrani interval pouzdanosti od 95% izračunat metodom Vilsonovog rezultata.

Tabela 62 prikazuje rezultate analize varijanse komponenti MSI rezultata za svaki izvor varijacije i ukupnu varijaciju u svim članovima panela sa ciljanim MSI-H statusom.

Tabela 62 Analiza komponenti varijanse MSI rezultata za ciljane članove MSI-H panela

Član panela	N	Srednja vrednost MSI rezultata	SD centra (%CV)	SD operatera (centar) (%CV)	SD dana (centar, operater) (%CV)	SD serije (%CV)	SD analize (%CV)	Ukupna SD (%CV)
TPSBD4	36	60,5	0,0 (0)	0,0 (0)	2,1 (3)	0,0 (0)	2,1 (3)	3,0 (5)
TPSBD6	32	55,7	0,0 (0)	1,3 (2)	1,0 (2)	0,8 (1)	2,9 (5)	3,4 (6)

TMB

Da bi se procenila ponovljivost TMB rezultata, sprovedena je kvantitativna analiza rezultata kod ciljanih članova TMB panela, što je predstavljalo opseg očekivanih TMB rezultata. Tabela 63 prikazuje rezultate analize varijanse komponenti TMB rezultata za svaki izvor varijacije i ukupnu varijaciju u svim TMB članovima panela. Ukupni SD TMB rezultata bili su 1,0 (%CV = 13) za jednog člana panela (srednji TMB rezultat = 7,6) i 1,1 (%CV = 2) za drugog člana panela (srednji TMB rezultat = 63,2).

Tabela 63 Analiza komponenti varijanse TMB rezultata za ciljane članove TMB panela

Član panela	N	Srednja vrednost TMB rezultata	SD centra (%CV)	SD operatera (centar) (%CV)	SD dana (centar, operater) (%CV)	SD serije (%CV)	SD analize (%CV)	Ukupna SD (%CV)
TPSBD3	28	7,6	0,2 (2)	0,0 (0)	0,8 (10)	0,0 (0)	0,5 (7)	1,0 (13)
TPSBD4	44	63,2	0,3 (1)	0,6 (1)	0,4 (1)	0,0 (0)	0,7 (1)	1,1 (2)

Postojao je 1 član TMB panela za koji je broj opservacija bio premali (N = 2) da bi model komponenti varijanse mogao uklopiti. Za ovog člana panela, ukupna SD je bila 1,7.

RNK varijante

Tabela 64 prikazuje PPC za ciljane RNK varijante. PPC su se kretali od 91,7% za KIF5B-RET do 100% za većinu RNK varijanti.

Tabela 64 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju RNK varijanti kod članova kombinovanog ciljanog panela

Uočeni nivo varijante ¹	Tip varijante	Ciljna varijanta	Srednja vrednost pratećih očitavanja ²	Procenat pozitivnog pozivanja (%)	95% CI ³
~2-3xLOD	Fuzija	ACPP-ETV1	44,7	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	EGFR-GALNT13	49,8	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	EML4-ALK	49,3	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	ESR1-CCDC170	45,1	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	FGFR1-GSR	61,1	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	FGFR3-TACC3	53,5	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Fuzija	KIF5B-RET	11,6	91,7% (44/48)	(80,4%, 96,7%)

Uočeni nivo varijante ¹	Tip varijante	Ciljna varijanta	Srednja vrednost pratećih očitavanja ²	Procenat pozitivnog pozivanja (%)	95% CI ³
<2xLOD	Fuzija	MKRN1-BRAF	33,4	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Fuzija	PAX3-FOXO1	70,1	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
<2xLOD	Fuzija	RAF1-VGLL4	15,9	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	SPIDR-NRG1	51,5	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)
~2-3xLOD	Fuzija	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9% (47/48)	(89,1%, 99,6%)
~2-3xLOD	Varijanta spajanja	EGFR vIII	64,0	100,0% (46/46)	(92,3%, 100,0%)
~2-3xLOD	Varijanta spajanja	Preskakanje MET egzona 14	61,2	100,0% (48/48)	(92,6%, 100,0%)

¹ Nivo varijante izračunat iz srednjih uočenih pratećih očitavanja.

² Srednja vrednost pratećih očitavanja izračunata iz uočenih rezultata analize.

³ Dvostrani interval pouzdanosti od 95% izračunat metodom Vilsonovog rezultata.

PNC je bio 100% za svaku ciljanu RNK varijantu, osim FGFR2-SRPK2 fuziju (PNC = 99,60% (984/988; 95% CI: 98,96% do 99,84%).

Tabela 65 prikazuje rezultate analize varijanse komponenti pratećih očitavanja za svaki izvor varijacije i ukupnu varijaciju u svim članovima panela sa ciljanim RNK varijantama.

Tabela 65 Analiza komponenti varijanse pratećih očitavanja za ciljane RNK varijante

Ciljna varijanta	N	Srednja vrednost pratećih očitavanja	SD centra (%CV)	SD operatera (centar) (%CV)	SD dana (centar, operater) (%CV)	SD serije (%CV)	SD analize (%CV)	Ukupna SD (%CV)
ACPP-ETV1	46	44,7	10,38 (23)	0,00 (0)	13,01 (29)	5,90 (13)	2,28 (5)	17,80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124,9	38,22 (31)	13,24 (11)	29,08 (23)	9,51 (8)	8,30 (7)	51,39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56,6	0,00 (0)	3,98 (7)	17,18 (30)	0,00 (0)	3,00 (5)	17,89 (32)

Ciljna varijanta	N	Srednja vrednost pratećih očitavanja	SD centra (%CV)	SD operatera (centar) (%CV)	SD dana (centar, operater) (%CV)	SD serije (%CV)	SD analize (%CV)	Ukupna SD (%CV)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48,9	18,27 (37)	13,42 (27)	17,01 (35)	0,00 (0)	1,50 (3)	28,38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49,8	0,00 (0)	6,90 (14)	14,86 (30)	2,08 (4)	2,82 (6)	16,75 (34)
EML4-ALK	48	49,3	0,00 (0)	12,18 (25)	19,10 (39)	8,83 (18)	1,94 (4)	24,39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45,1	2,30 (5)	0,00 (0)	12,37 (27)	0,00 (0)	8,08 (18)	14,95 (33)
FGFR1-GSR	46	61,1	8,57 (14)	1,31 (2)	11,15 (18)	9,23 (15)	5,18 (8)	17,65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53,4	3,18 (6)	10,90 (20)	15,85 (30)	15,29 (29)	3,10 (6)	24,97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53,5	17,43 (33)	0,00 (0)	12,38 (23)	5,81 (11)	3,46 (6)	22,42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58,0	0,00 (0)	12,15 (21)	18,22 (31)	0,00 (0)	3,96 (7)	22,26 (38)
KIF5B-RET	48	11,6	0,89 (8)	0,00 (0)	3,97 (34)	1,44 (12)	1,09 (9)	4,45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33,4	6,98 (21)	8,19 (25)	13,02 (39)	6,63 (20)	4,00 (12)	18,58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70,1	12,45 (18)	10,79 (15)	17,91 (26)	3,02 (4)	2,42 (3)	24,65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15,9	1,46 (9)	1,52 (10)	3,80 (24)	4,42 (28)	1,23 (8)	6,32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51,5	4,78 (9)	0,00 (0)	10,69 (21)	5,94 (12)	3,29 (6)	13,54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43,5	5,63 (13)	8,81 (20)	9,98 (23)	0,00 (0)	6,21 (14)	15,73 (36)
EGFR viii varijanta spajanja	46	64,0	12,70 (20)	0,42 (1)	17,69 (28)	0,00 (0)	2,34 (4)	21,90 (34)

Ciljna varijanta	N	Srednja vrednost pratećih očitavanja	SD centra (%CV)	SD operatera (centar) (%CV)	SD dana (centar, operater) (%CV)	SD serije (%CV)	SD analize (%CV)	Ukupna SD (%CV)
Varijanta preskakanja spajanja MET egzona 14	48	61,2	11,42 (19)	3,43 (6)	19,84 (32)	7,55 (12)	2,10 (3)	24,43 (40)

Preciznost u okviru laboratorije

Sprovedene su dve studije za procenu preciznosti u okviru laboratorije za TSO Comprehensive (EU). Studija 1 je procenila NTRK i RET fuzije, kao i RET male DNK varijante. Studija 2 je procenila TMB i MSI.

Studija 1

Preciznost u okviru laboratorije procenjena je za NTRK1 – 3 fuzije (gliom niskog stepena diferencijacije, glioblastoma multiforme, miofibroblastni sarkom, sekretorni karcinom dojke), RET fuzije (karcinom tireoidne žlezde i tkivo kože iz nepoznatog karcinoma) i RET male DNK varijante (medularni karcinom tireoidne žlezde) sa FFPE tkivima iz naznačenih karcinoma. Svaki uzorak je testiran na dva nivoa varijante: ~1x LoD (nizak nivo varijante) i ~2 – 3x LoD (visok nivo varijante) osim za uzorak koji sadrži CCDC6-RET, koji je testiran samo na niskom nivou varijante. Svaki od uzoraka na svakom nivou testa analiziran je u duplikatima u svakom događaju pripreme biblioteke od strane tri (3) operatera. Svaki operater je započeo pripremu biblioteke na tri (3) neuzastopna startna dana i sekvencirao na tri (3) označena NextSeq 550Dx instrumenta. Tri (3) serije reagenasa su testirane, generišući 54 opservacije po nivou. Neki nivoi su imali manje od 54 opservacija zbog nevažjećih biblioteka.

Kvalitativna analiza

Kvalitativna podudarnost pozivanja na varijantu, procenjena je odvojeno za dva nivoa varijante za datu varijantu, iz objedinjenih opservacija u svim varijablama (operateri, serije reagenasa, instrumenti, dani i replikati). Procenat pozitivnih pozivanja (PPC) i procenat negativnih pozivanja (PNC) i povezani dvostrani interval pouzdanosti od 95% (Vilsonov rezultat) sumirani su u [Tabela 66](#) (male DNK varijante) i [Tabela 67](#) (RNK fuzije).

Na visokom nivou varijante (~2 – 3x LoD), TSO Comprehensive (EU) analiza je pokazala 100% za PPC i PNC za sve testirane varijante.

Na niskom nivou varijante (~1x LoD), PPC za male DNK varijante kretala se od 83,3% do 98,1%, a PPC za RNK fuzije kretala se od 90,7% do 100%. Za varijante sa PPC < 95%, srednja VAF (RET C634Y i RET D898_E901del) ili prateća očitavanja (NCOA4-RET i BCAN-NTRK1), bila su ispod odgovarajućih granica detekcije. Na niskom nivou varijante, 100% PNC je postignut za sve varijante.

Tabela 66 Kvalitativni rezultati za ciljanu DNK varijantu

Nivo varijante	Varijanta	Tip varijante	Srednja VAF	PPC (95% CI)	PNC (95% CI)
Nizak (~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	DELECIJA	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*	DELECIJA	0,056	98,1% (53/54) (90,2% – 99,7%)	100,0% (215/215) (98,2% – 100,0%)

Nivo varijante	Varijanta	Tip varijante	Srednja VAF	PPC (95% CI)	PNC (95% CI)
Visok (~3x LoD)	RET C634Y	MNV	0,095	100,0% (54/54) (93,4% – 100,0%)	100,0% (192/192) (98,0% – 100,0%)
	RET D898_E901del	DELECIJA	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*	DELECIJA	0,161	100,0% (32/32) (89,3% – 100,0%)	100,0% (214/214) (98,2% – 100,0%)

* Promene nukleotida su navedene za svaku varijantu u odeljku Granica detekcije, osim za RET D631_L633delinsE, koji je hromozom 10, položaj 43609940, referenca ACGAGCT, alternativa A.

Tabela 67 Kvalitativni rezultati za ciljane RNK fuzije

Nivo varijante	Fuzija	Srednja vrednost pratećih očitavanja	PPC (95% CI)	PNC (95% CI)
Nizak	TPM3-NTRK1	20,2	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (537/537) (99,3%, 100,0%)
	BCAN-NTRK1	22,1	94,4% (51/54) (84,9%, 98,1%)	100,0% (591/591) (99,4%, 100,0%)
	ETV6-NTRK2	20,3	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (591/591) (99,4%, 100,0%)
	ETV6-NTRK3	16,2	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (537/537) (99,3%, 100,0%)
	ETV6-NTRK3 (FFPE ćelijska linija)	23,1	98,1% (53/54) (90,2%, 99,7%)	
	NCOA4-RET	13,3	90,7% (49/54) (80,1%, 96,0%)	100,0% (537/537) (99,3%, 100,0%)
	CCDC6-RET	18,7	98,1% (53/54) (90,2%, 99,7%)	100,0% (591/591) (99,4%, 100,0%)
	Visok	TPM3-NTRK1	57,1	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)
BCAN-NTRK1		53,2	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (535/535) (99,3%, 100,0%)
ETV6-NTRK2		52,0	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (535/535) (99,3%, 100,0%)
ETV6-NTRK3		41,7	100,0% (54/54) (93,4%, 100,0%)	100,0% (481/481) (99,2%, 100,0%)
ETV6-NTRK3 (FPE ćelijska linija)		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		N/P	Nije testirano	100,0% (589/589) (99,4%, 100,0%)

Kvantitativna analiza

Analiza različitih komponenata sa ograničenom maksimalnom verovatnoćom (REML) obavljena je da bi se procenila ukupna varijacija osnovne kontinuirane promenljive (VAF za male DNK varijante i prateća očitavanja za RNK fuzije) i procenile komponente preciznosti [standardna devijacija (SD), koeficijent varijacije (CV)] za svaki izvor varijacije [operateri, instrumenti, dani, serije reagenasa, rezidualni i ukupni]. Rezultati su predstavljeni u [Tabela 68](#) za male DNK varijante i [Tabela 69](#) za RNK fuzije.

Varijacija u VAF se povećala sa srednjom vrednošću kao što se očekivalo za binomnu proporciju. Varijacija u pratećim očitavanjima se povećala sa srednjom vrednošću kao što se očekivalo sa podacima o broju. Preostala komponenta je dala najveći doprinos ukupnoj varijansi za male DNK varijante i RNK fuzije na oba nivoa, što je potkrepilo zaključak da je detekcija ovih varijanti pomoću TSO Comprehensive (EU), robustna po pitanju operatera, serija, instrumenata i dana.

Tabela 68 Kvantitativna SD i CV rezultati za ciljane male DNK varijante

VAF nivo	Varijanta	Tip varijante	N važeći pokušaji	Srednja VAF	Operater SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	SD serije (%CV)	SD dan (%CV)	Rezidualno SD (%CV)	Ukupno SD (%CV)
Nizak (~1x LoD)	RET D898_ E901del	DELECIJA	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	DELECIJA	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 nivo	Varijanta	Tip varijante	N važeći pokušaji	Srednja VAF	Operater SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	SD serije (%CV)	SD dan (%CV)	Rezidualno SD (%CV)	Ukupno SD (%CV)
Visok (~3x LoD)	RET D898_E901del	DELECIJA	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	DELECIJA	52*	0,164	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,005 (3,0)	0,000 (0,0)	0,020 (12,1)	0,020 (12,4)

Tabela 69 Kvantitativni rezultati SD i CV za ciljane RNK fuzije

Nivo pratećih očitavanja	Fuzija	N važeći pokušaji	Srednja vrednost pratećih očitavanja	SD operatera (%CV)	SD instrumenta (%CV)	SD serije (%CV)	SD dana (%CV)	Rezidualna SD (%CV)	Ukupna SD (%CV)
Nizak	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 (ćelijska linija)	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)

Nivo pratećih očitavanja	Fuzija	N važeći pokušaji	Srednja vrednost pratećih očitavanja	SD operatera (%CV)	SD instrumenta (%CV)	SD serije (%CV)	SD dana (%CV)	Rezidualna SD (%CV)	Ukupna SD (%CV)
Visok	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 (ćelijska linija)	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)

Studija 2

Preciznost u okviru laboratorije procenjena je za TMB i MSI. Pet NSCLC FFPE DNK uzoraka za TMB i sedam CRC FFPE uzoraka za MSI, uključujući i mikrosatelitsku stabilnost (MSS) i visoki MSI, korišćeni su za procenu preciznosti na različitim nivoima u rasponu rezultata. Svaki od uzoraka je analiziran u duplikatu od strane tri (3) operatera, tri (3) dana, sa tri (3) pripreme biblioteke za tri (3) serije reagenasa koristeći tri NextSeq 550Dx instrumente koji generišu 54 opservacije po nivou.

Kvalitativna podudarnost procenjena je za MSI status. TSO Comprehensive (EU) analiza demonstrirala je podudarnost od 100% za procenat pozitivnih pozivanja i procenat negativnih pozivanja za MSI status. Za TMB, TSO Comprehensive (EU) analiza prijavljuje TMB rezultat; kvalitativna podudarnost nije primenljiva.

Ukupna varijacija TMB i MSI rezultata, zajedno sa doprinosom po izvoru (instrumenti, operateri, serije, dani i rezidualno), kvantifikovana je korišćenjem modela komponenti varijanse u rasponu rezultata. Standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV) prikazani su u [Tabela 70](#) za TMB i [Tabela 71](#) za MSI po nivou. Neki nivou su imali manje od 54 opservacija zbog nevažjećih biblioteka.

Tabela 70 Kvantitativni TMB rezultat SD i CV rezultati

Nivo	Srednja vrednost TMB rezultata	N važeći pokušaji	Operater SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Serija SD (%CV)	Dan SD (%CV)	Rezidualno SD (%CV)	Ukupno 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%)

Tabela 71 Kvantitativni MSI rezultat SD i CV rezultati

MSI status	Nivo	Srednja vrednost MSI rezultata (%)	N važeći pokušaji	Operater SD (%CV)	Instrument SD (%CV)	Seriya SD (%CV)	Dan SD (%CV)	Rezidualno SD (%CV)	Ukupno SD (%CV)
MS-stabilno	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-visok	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%)

Varijacija u TMB rezultatima ima tendenciju da se poveća sa srednjom vrednošću kao što se očekuje od teorijskih distribucija podataka o broju. Varijacija u MSI rezultatima za nivoe u blizini MSI rezultata = 50 su veće od varijacije MSI rezultata bliže 0, ili 100 u skladu sa varijabilnošću u odnosu na teorijske distribucije podataka o proporciji. Preostala komponenta je dala najveći doprinos ukupnoj varijansi za MSI i TMB rezultate, što je potkrepilo zaključak da su rezultati robustni za operatore, serije, instrumente i dane.

Vrednosti C5 i C95 oko preseka od 20,00% utvrđene su za MSI pomoću profila preciznosti (Tabela 72).

Tabela 72 C5-C95 intervali za MSI

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

Međutim, pošto su MSI i TMB složeni biomarkeri, analitičke performanse mogu varirati od uzorka do uzorka. To jest, TMB varijacija zavisi ne samo od TMB vrednosti, već i od sastava varijanti u uzorku, kao što su varijantni tip (SNV, Indel) i VAF nivo (blizina preseka za uključivanje). Isto tako, MSI varijacija zavisi ne samo od MSI vrednosti, već i od sastava lokacija u uzorku, kao što je broj lokacija koje su nestabilne i količina nestabilnosti po lokaciji.

Procenjen je uticaj sadržaja tumora na TMB i MSI rezultate. Za većinu uzoraka, sadržaj tumora ≥ 30% je imao zanemarljiv uticaj na TMB rezultate iznad približno 10 mutacija po megabazi. TMB rezultati su ostali relativno nepromenjeni sa povećanjem sadržaja tumora. Za uzorke sa visokim MSI, sadržaj tumora je pokazao pozitivnu,

linearnu korelaciju sa MSI rezultatom. Uzorci sa visokim MSI ostali su MSI-H u proseku kada je sadržaj tumora bio $\geq 30\%$. Uzorci endometrijuma su se ponašali različito u odnosu na druge tipove tkiva i utvrđeno je da je potrebna veća količina sadržaja tumora radi pozivanja MSI-H.

Tačnost za profilisanje tumora

Detekcija varijanti TSO Comprehensive (EU) analizom upoređena je sa rezultatima referentnih metoda. Male DNK varijante i TMB su upoređeni sa eksternom potvrđenom NGS metodom celog egzoma. Amplifikacija gena je upoređena u odnosu na istu NGS metodu celog egzoma ili potvrđenu metodu dvostruke hibridizacije in situ (DISH) za HER2 amplifikacije. MSI je procenjena u odnosu na potvrđeni MSI-PCR test. RNK varijante spajanja upoređene su u odnosu na potvrđenu kvantitativnu PCR (qPCR) metodu. ROS1 i ALK fuzije su upoređene u odnosu na FISH analize. Sve ostale fuzije su upoređene sa kompozitnom metodom koja se sastojala od potvrđene NGS analize celog RNK egzoma (RNGS1), ciljanog NGS panela (RNGS2) i digitalnog kapljičnog PCR (ddPCR).

Detekcija male DNK varijante

Detekcija malih DNK varijanti pomoću TSO Comprehensive (EU) testa upoređena je sa rezultatima sekvenciranja celog egzoma (WES) koji koristi WES sa uparenim podudarnim normalnim uzorcima tumora za zametnu liniju i pozivanje na somatske male varijante. Poređenje između malih varijanti, koje se sastoje od varijanti pojedinačnih nukleotida (SNV), insercija i delecija, zasnovano je na 124 uzorka iz 14 različitih tipova tkiva koji su bili validni za TSO Comprehensive (EU) i za WES. TSO Comprehensive (EU) ali ne i WES analiza koja može da detektuje multinukleotidne varijante (MNV, 2 – 3bp) koje zahtevaju faze. TSO Comprehensive (EU) MNV su ocenjeni kao individualni SNV u odnosu na WES. Sažetak podudarnosti na nivou varijante, uključujući pozitivan procenat poklapanja (PPA) i negativan procenat poklapanja (NPA) za sve pozive na varijante, prikazan je u [Tabela 73](#).

Tabela 73 Sažetak podudarnosti za pozive na male varijante procenjene prema zametnoj liniji ili somatskom statusu

	WES somatsko pozivanje	WES pozivanje zametne linije	WES nije pozvano
TSO Comprehensive (EU) Pozvano	382	33.163	426
TSO Comprehensive (EU) Nije pozvano	69	61	70.000.481
Ukupno	451	33.224	70.000.907

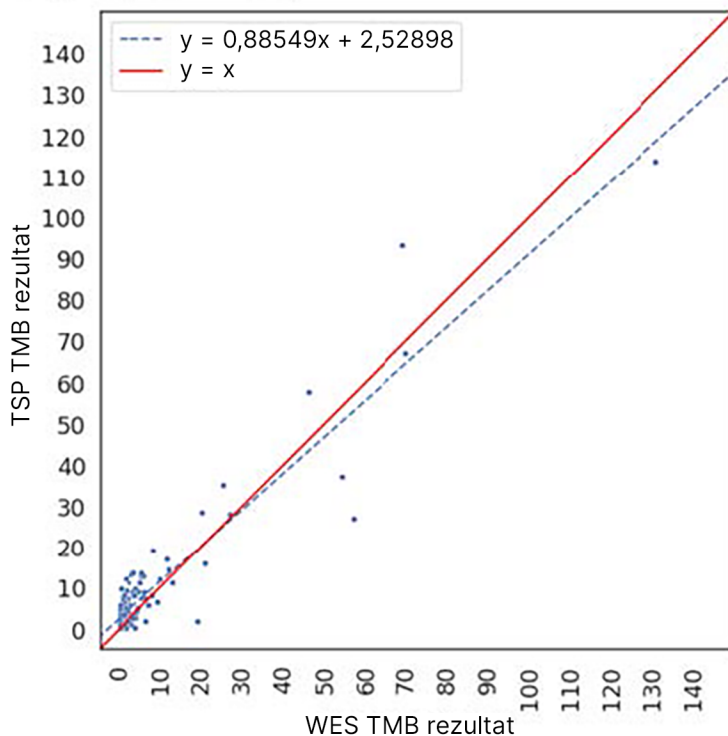
	WES somatsko pozivanje	WES pozivanje zametne linije	WES nije pozvano
Procenat poklapanja	PPA: 85% (382/451), 95% CI: [81% – 87%]	PPA: > 99% (33.163/33.224) 95% CI: (99,8% – 99,9%)	NPA: > 99% (70.000.481/70.000.907) 95% CI: [99,999% – 99,999%]

Ukupno, TSO Comprehensive (EU) je pozvao 426 varijanti koje nisu detektovane u WES metodi. Dve stotine četiri (48%) ovih varijanti imale su različitu ulestalost alela ispod praga za pozivanje u WES metodi. Od preostalih potencijalno lažnih pozitivnih varijanti, bilo je dokaza o varijanti pozivanja u WES metodi sa niskom potporom. Takođe, mnoge varijante su imale vrlo nizak nivo WES dokaza u uparenim normalnim uzorcima. Ovaj rezultat ukazuje na to da su ove varijante propuštene u tumoru od strane WES metode, zbog tumora u normalnoj kontaminaciji.

Detekcija opterećenosti tumora mutacijama

TMB podudarnost je određena upoređivanjem TMB rezultata (somatske mutacije/megabaza) između WES metode i TSO Comprehensive (EU) za 124 uzorka sa dostupnim podacima pomoću TSO Comprehensive (EU) i pomoću WES. Analiza linearne regresije pomoću WES kao predviđačem imala je y-presretanje od 2,53, nagib od 0,89, i Pirsonov koeficijent korelacije od 0,94 (Slika 3).

Slika 3 TMB rezultat korelacije između WES i TSO Comprehensive (EU)



Detekcija amplifikacije gena

Detekcija amplifikacije gena pomoću TSO Comprehensive (EU) analize upoređena je sa rezultatima iste WES analize pomoću uzoraka koji se podudaraju sa normalnim tumorom ili samo uzoraka tumora. Ukupno je bilo 420 uzoraka od kojih je 183 koristilo ortogonalni tumor/normalnu metodu, a 237 je koristilo samo metodu tumora. Uzorci su bili iz 14 tipova tkiva i sadržavali su amplifikacije iz 55 gena. TSO Comprehensive (EU) izveštava o amplifikacijama gena iz MET i ERBB2 gena. Međutim, tačnost je procenjena na svih 55 gena. Sažetak pozivanja na amplifikaciju gena prikazan je u [Tabela 74](#).

Tabela 74 Pozivanja na amplifikaciju gena

	WES pozitivno	WES negativno
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno	337	415
TSO Comprehensive (EU) Negativno	28	24.000
Ukupno	365	24.415
Procenat poklapanja	PPA: 92% (337/365) 95% CI: [89%, 95%]	NPA: 98,3% (24.000/24.415) 95% CI: [98,1%, 98,5%]

ERBB2 (HER2) amplifikacije u gastričnom tkivu i tkivu dojke analizirane su odvojeno od drugih amplifikacija gena pomoću metode dvostruke hibridizacije in situ (DISH). Ukupno je testirano 116 uzoraka dojke i uzoraka gastričnog tkiva, od kojih je 64 prethodno okarakterisano kao HER2 pozitivno IHC ili FISH metodom. Jedan uzorak nije imao uspešnu ekstrakciju, 3 uzorka nisu imala uspešnu potvrdu za TSO Comprehensive (EU), a 3 uzorka nisu imala uspešnu potvrdu za DISH analizu. Od 108 uzoraka, 20 (18,5%) je imalo granične rezultate (između 1,5 i 2,5) blizu DISH preseka od 2,0. Rezultati podudarnosti, uključujući PPA, NPA za sve uzorke i isključujući granične HER2 DISH slučajeve, prikazani su u [Tabela 75](#).

Tabela 75 Sažetak podudarnosti između TSO Comprehensive (EU) i HER2 DISH uključujući amplifikaciju HER2 gena

Amplifikacija HER2 gena (tkivo dojke i gastrična tkiva)	Amplifikacija HER2 DISH	Bez amplifikacije HER2 DISH
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno	17 (uključujući 1 graničan)	13 (uključujući 1 graničan)
TSO Comprehensive (EU) Negativno	10 (uključujući 6 graničnih)	68 (uključujući 12 graničnih)
Procenat poklapanja uključujući granične slučajeve	PPA: 63% (17/27) 95% CI: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95% CI: [74%, 90%]
Procenat poklapanja isključujući granične slučajeve	PPA: 80% (16/20) 95% CI: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95% CI: [72%, 90%]

Detekcija nestabilnosti mikrosatelita

Detekcija nestabilnosti mikrosatelita pomoću TSO Comprehensive (EU) analize upoređena je sa rezultatima potvrđenog MSI-PCR testa koji koristi uzorke koji se podudaraju sa normalnim tumorom za testiranje. Upoređeno je ukupno 195 uzoraka, koji ispunjavaju zahtev za sadržaj tumora $\geq 30\%$ i predstavljaju 14 tipova tkiva. MSI-PCR se koristi za procenu na 5 lokacija i ima 3 ishoda—MSS (bez nestabilnih lokacija), MSI-nizak (jedna nestabilna lokacija) i MSI-visok (dve ili više nestabilnih lokacija). TSO Comprehensive (EU) procenjuje do 130 lokacija mikrosatelita i klasifikuje uzorke samo kao MSS ili MSI-visok ($\geq 20\%$ nestabilnih lokacija). MSI-nizak grupisan je pomoću MSS ishoda za MSI-PCR. Analiza podudarnosti prikazana je u [Tabela 76](#).

Tabela 76 Sažetak analize podudarnosti između TSO Comprehensive (EU) i MSI-PCR za DNK nestabilnost mikrosatelita

MSI nestabilnost	PCR MSI-visok	PCR MSI-nizak	PCR MSS
TSO Comprehensive (EU) Nestabilno (MSI-visok)	40	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabilno (MSS)	3	0	150
Ukupno	43	2	150
Procenat poklapanja	PPA: 93% (40/43) 95% CI: [81%, 98%]	NPA: 99% (150/152) 95% CI: [95%, > 99%]	

Detekcija RNK varijante spajanja

Tačnost detekcije varijante spajanja izračunata je upoređivanjem TSO Comprehensive (EU) rezultata sa qPCR analizama za EGFRvIII i Met Exon 14del, uključujući jednu poznatu pozitivnu RNK za svaku varijantu spajanja. Analiza podudarnosti obavljena je na ukupno 230 jedinstvenih FFPE RNK uzoraka iz 14 tipova tkiva sa dostupnim podacima pomoću TSO Comprehensive (EU) i referentne metode. Svi uzorci su testirani na MET Exon 14del, dok je EGFRvIII testiran samo na tkivu mozga. Tri uzorka su bila pozitivna na MET Exon 14del pomoću qPCR, ali ne pomoću TSO Comprehensive (EU) i imala su prosečan Ct > 37 i bila su ispod TSO Comprehensive (EU) nivoa LoD. [Tabela 77](#) sumira rezultate studije podudarnosti.

Tabela 77 Sažetak analize podudarnosti između TSO Comprehensive (EU) i qPCR analize za RNK varijante spajanja

RNK varijante spajanja	qPCR pozitivno	qPCR negativno
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negativno (EGFRvIII)	0	13

RNK varijante spajanja	qPCR pozitivno	qPCR negativno
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno (Met Exon 14Del)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Negativno (Met Exon 14Del)	3	217
Ukupno	7	230
Procenat poklapanja	PPA: 57% (4/7) 95% CI: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95% CI: [98%, 100%]

Detekcija RNK fuzije

Poređenje sa kompozitnom metodom

TSO Comprehensive (EU) fuzije su upoređene sa kompozitnom metodom koja se sastoji od sekvenciranja RNK celog egzoma pomoću NGS panela (RNGS1), ciljanog NGS fuzionog panela (RNGS2) i digitalnog kapljičnog PCR (ddPCR).

RNGS1 metoda se preklapa sa svim genima za koje TSO Comprehensive (EU) može da se detektuje fuzija. Međutim, granica detekcije RNGS1 metode bila je 4X – 8X na TSO Comprehensive (EU) osnovu broja pratećih očitavanja uočenih u preklapajućim pozivima na fuziju. Dakle, kompozitna metoda koja koristi dve dodatne metode sa većom osetljivošću, ali manjom širinom za fuzije, korišćena je sa WES (RNGS1) metodom.

Testirano je ukupno 255 jedinstvenih RNK uzoraka koji predstavljaju 14 tipova tkiva i TSO Comprehensive (EU) pokazatelja prolaska pomoću RNGS1. Dva uzorka su bila nevažeca za kontrolu kvaliteta RNGS1 uzorka i isključena su iz dodatne analize. Od 82 fuzije sa pozivanjem od strane TSO Comprehensive (EU), 4 su isključene iz procene zbog neuspešnosti kontrole kvaliteta RNGS1 uzorka, a 7 dodatnih fuzija nisu bile pozivane zbog odsustva ciljeva u RNGS1 panelu. Od preostalih 71 fuzija sa pozivanjem od strane TSO Comprehensive (EU), 9 fuzija je potvrđeno pomoću RNGS1. RNGS1 je pozvala na 4 fuzije, koje nije pozvao TSO Comprehensive (EU).

Od 62 fuzije koje su bile TSO Comprehensive (EU) pozitivne, a nisu detektovane od strane RNGS1, 13 se preklapalo i potvrđene su od strane RNGS2. Jedna fuzija je pozvana od strane RNGS2, ali nije pozvana od strane TSO Comprehensive (EU).

Digitalni kapljični PCR se zatim koristio za fuzije pozvane od strane TSO Comprehensive (EU), a koje nije pozvao, ili nije mogao da pozove RNGS1, a koje nije procenjivao RNGS2 (49). Pored toga, ddPCR je korišćen za ponovnu procenu 2 od 4 lažno negativne fuzije za TSO Comprehensive (EU) pomoću RNGS1 i 2 od 9 podudarnih fuzija za TSO Comprehensive (EU) i RNGS1. Negativni uzorci sa pet fuzija bili su uključeni uz testiranje svakog pozitivnog uzorka fuzije kako bi se obezbedila specifičnost. Osamnaest fuzija nije testirano pomoću ddPCR zbog nemogućnosti da se dizajniraju prajmeri/sonde, više partnerskih gena za fuziju ili nedovoljnog preostalog FFPE materijala. Za ddPCR, prajmeri i sonde su dizajnirani u odnosu na uočene tačke prekida u TSO Comprehensive (EU) analizi.

U ukupno 52 fuzije detektovao je ddPCR, 41 od tih fuzija je pozvano od strane TSO Comprehensive (EU), ali nije pozvano ili nije moglo da se pozove od strane RNGS1. Devet fuzija je pozvano pomoću ddPCR, ali negativno u TSO Comprehensive (EU) ili RNGS1. Dve ddPCR pozitivne fuzije potvrdile su 2 podudarne fuzije za TSO Comprehensive (EU) i RNGS1. Fuzija nije detektovana pomoću ddPCR za 2 ponovno procenjena TSO Comprehensive (EU) lažno negativna pomoću RNGS1; međutim, one su se računale kao lažno negativne na osnovu poređenja RNGS1.

Metode kompozitnih rezultata podudarnosti RNGS1, RNGS2 i ddPCR za fuzije prikazane su u [Tabela 78](#).

63 fuzije podudarne sa kompozitnom metodom, predstavljale su 43 gena u TSO Comprehensive (EU) panelu. Međutim, fuzije su podobne za prijavljivanje samo iz 23 gena navedenih u [TSO Comprehensive \(EU\) Panel analize gena na stranici 2](#).

Tabela 78 Unakrsna tabelarnost TSO Comprehensive (EU) naspram ishoda kompozitne metode za RNK fuzije (253 uzorka)

Fuzije	Kompozitna metoda pozitivna	Kompozitna metoda negativna
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno	63 ¹	18
TSO Comprehensive (EU) Negativno	14 ²	13.821
Ukupno	77	13.839
Procenat poklapanja	PPA: 82% (63/77) 95% CI: [72%, 89%]	NPA: 99,9% (13.821/13.839) 95% CI: (99,8%, 99,9%)

¹ 63 TSO Comprehensive (EU) tačno pozitivno = 9 pozitivnih podudarnih pomoću RNGS1 + 13 pozitivnih podudarnih pomoću RNGS2 + 41 pozitivnih podudarnih pomoću ddPCR.

² 14 TSO Comprehensive (EU) lažno negativno = 4 negativne koje nisu podudarne pomoću RNGS1 + 1 negativna koja nije podudarna pomoću RNGS2 + 9 negativnih koje nisu podudarne pomoću ddPCR.

Poređenje sa FISH metodom za ROS1 i ALK fuzije

Testirano je dvadeset pet NSCLC uzoraka pomoću FISH metode za ROS1 i ALK fuzije, odnosno testirano je 5 dodatnih NSCLC uzoraka na ROS1 fuziju. Osam uzoraka je bilo neuspešno pomoću FISH metode za ROS1, zbog neadekvatnog tkiva. Dve ROS1 i jedna ALK fuzija detektovane su i od strane TSO Comprehensive (EU) i od strane i od strane FISH metode. Nisu uočeni nepodudarni rezultati. [Tabela 79](#) sumira rezultate podudarnosti za TSO Comprehensive (EU) i FISH metodu za ROS1 i ALK fuzije.

Tabela 79 Sažetak rezultata podudarnosti za TSO Comprehensive (EU) i FISH metodu za ROS1 i ALK fuzije

ALK+ROS1	FISH pozitivno	FISH negativno
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno	3	0

ALK+ROS1	FISH pozitivno	FISH negativno
TSO Comprehensive (EU) Negativno	0	44
Ukupno	3	44
Procenat poklapanja	PPA: 100% (3/3) 95% CI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95% CI: [92%, 100%]

Validnost uzorka

Validnost uzorka (prvi pokušaj) izmerena je za 181 jedinstveni RNK uzorak i 272 jedinstvena DNK uzorka iz FFPE blokova ≤ 5 godina starosti. Ovi uzorci su izabrani na osnovu tipa tkiva i dostupnog materijala; validnost analize nije bila poznata. Pokazatelj kontrole kvaliteta biblioteke mora proći da bi se tip varijante smatrao važećim. Validnost uzorka procenjena je odvojeno za svaki od tipova varijanti (male DNK varijante/TMB, MSI, amplifikacije gena, fuzije/varijante spajanja) i prikazana je u [Tabela 80](#).

Tabela 80 Validnost uzorka

Tip varijante	Validnost uzorka
Varijante fuzije/spajanja (RNK)	76%
Male DNK varijante/TMB	75%
MSI	72%
Amplifikacija gena	94%

Sažetak analitičke validacije za tvrdnje o profilisanju tumora

Na osnovu podataka o granici detekcije, preciznosti, ponovljivosti i tačnosti, TSO Comprehensive (EU) je analitički potvrđen za sledeće:

- Male DNK varijante—SNV, MNV, insercije i delecije
- TMB
- MSI
- MET i ERBB2 (HER2) amplifikacije gena (pogledajte [TSO Comprehensive \(EU\) Panel analize gena na stranici 2](#)).
- 23 gena za koja se mogu detektovati fuzije (pogledajte [TSO Comprehensive \(EU\) Panel analize gena na stranici 2](#)).
- EGFR i MET varijante spajanja (pogledajte [TSO Comprehensive \(EU\) Panel analize gena na stranici 2](#)).

NTRK Kliničke performanse

Da bi se potvrdila TSO Comprehensive (EU) analiza kao prateća dijagnostika (CDx) za izbor pacijenata za lečenje lekom VITRAKVI® (larotrectinib), uzorci pacijenata uključeni u klinička ispitivanja larotrectiniba (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687; koji se kolektivno nazivaju uzorci za ispitivanje larotrectiniba) korišćenjem preseka podataka od 15. jula 2019. godine, dopunjenog FFPE uzorcima tkiva komercijalnog porekla, testirani su da bi se podržala studija preciznosti TSO Comprehensive (EU) analize i klinička studija premošćavanja.

NCT02122913 je bila multicentrična, otvorena studija 1. faze sa povećanjem doze kod odraslih pacijenata sa uznapredovalim solidnim tumorima (svi učesnici), koji nisu izabrani za karcinom sa pozitivnom NTRK fuzijom. Nakon dela studije sa povećavanjem doze, započeta je ekspanzija doze za pacijente sa dokumentovanim karcinomom sa pozitivnom NTRK fuzijom i za pacijente za koje je istraživač verovao da mogu imati koristi od visoko-selektivnog TRK inhibitora. NAVIGATE NCT02576431 je tekuća, multicentrična, otvorena, studija 2. faze kod pacijenata starosti 12 i više godina sa rekurentnim uznapredovalim solidnim tumorima sa dokumentovanom NTRK fuzijom, prema proceni spoljne laboratorije. SCOUT NCT02637687 je tekuća, multicentrična, otvorena studija 1/2 faze kod pedijatrijskih pacijenata starosti od rođenja do 21 godine sa uznapredovalim solidnim ili primarnim tumorima centralnog nervnog sistema (CNS).

Od pacijenata pozitivnih na NTRK fuziju uključeni u TSO Comprehensive (EU) studiju analize, 164 je formiralo prošireni skup primarne efikasnosti larotrectiniba (ePAS4).

Studija tačnosti za detekciju fuzije NTRK1, NTRK2, NTRK3

Tačnost TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju NTRK fuzija (NTRK1, NTRK2 ili NTRK3) kod pacijenata sa solidnim tumorima demonstrirana je procenom podudarnosti rezultata NTRK fuzije između TSO Comprehensive (EU) analize i potvrđene ortogonalne metode zasnovane na NGS.

Sprovedena je retrospektivna, neintervencijska studija. Testirani su uzorci ispitivanja larotrectiniba i dodatni uzorci pomoću TSO Comprehensive (EU) analize u jednom spoljnom centru i ortogonalnom metodom u centralnoj laboratoriji. Tačnost pozivanja na NTRK fuziju TSO Comprehensive (EU) testa procenjena je u odnosu na ortogonalnu metodu; izračunat je procenat pozitivnog poklapanja (PPA), procenat negativnog poklapanja (NPA) i povezani dvostrani intervali pouzdanosti od 95% (CI).

Testirano je 516 uzoraka pomoću TSO Comprehensive (EU) analize i/ili ortogonalne metode. Od ovih uzoraka, 499 je testirano obema metodama. Sedamnaest od 516 uzoraka nije testirano jednom od analiza zbog neuspele ekstrakcije, nepoznatog razloga (za ortogonalnu metodu) ili odstupanja od protokola. Od 499 uzoraka testiranih obama metodama, 170 (34,1%) su bili uzorci ispitivanja larotrectiniba, a 329 (65,9%) su bili dodatni uzorci.

Unakrsna tabulacija rezultata za 499 uzoraka prikazana je u [Tabela 81](#). Od 499 uzoraka, 85 uzoraka je imalo nevažne rezultate TSO Comprehensive (EU) analize; od ovih 85, 53 je imalo i nevažne rezultate ortogonalne metode. Dodatnih 7 uzoraka imalo je nevažne rezultate ortogonalne metode. Tako je 407 od 499 uzoraka imalo validne rezultate obema metodama.

Tabela 81 NTRK studija tačnosti: Unakrsna tabelarnost TSO Comprehensive (EU) rezultata naspram rezultata ortogonalne metode za detekciju NTRK fuzije

TSO Comprehensive (EU) Rezultat analize	Rezultat ortogonalne metode			
	NTRK fuzija pozitivna	NTRK fuzija negativna	Nevažeći	Ukupno
NTRK fuzija pozitivna	114	16	1	131
NTRK fuzija negativna	4	273	6	283
Nevažeći*	4	28	53	85
Ukupno	122	317	60	499

* TSO Comprehensive (EU) nevažeći rezultati analize dolaze sa nivoa uzorka i ciklusa.

Analize poklapanja, isključujući i uključujući nevažeće rezultate TSO Comprehensive (EU) analize, prikazane su u [Tabela 82](#). Izuzimajući nevažeće rezultate TSO Comprehensive (EU) analize, PPA je bio 96,6% (114/118; 95% CI: 91,5% - 99,1%) a NPA 94,5% (273/289; 95% CI: 91,2% - 96,8%).

Tabela 82 NTRK studija tačnosti: PPA i NPA TSO Comprehensive (EU) analize u poređenju sa rezultatom ortogonalne metode za detekciju NTRK fuzija

Merenje poklapanja	Isključujući nevažeće rezultate TSO Comprehensive (EU) analize		Uključujući nevažeće rezultate TSO Comprehensive (EU) analize	
	Poklapanje, % (n/N)	95% CI*	Poklapanje, % (n/N)	95% 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%

*CI od 95% na osnovu (egzaktne) Klover-Pirson metode.

Klinička studija premošćavanja za NTRK1, NTRK2, NTRK3 detekciju fuzije

Klinička validnost TSO Comprehensive (EU) analize za detekciju NTRK1, NTRK2 ili NTRK3 fuzija kod pacijenata sa solidnim tumorima, koji mogu imati koristi od lečenja larotrectinibom, demonstrirana je u kliničkoj studiji premošćavanja. Studija je sprovedena da bi se procenila klinička efikasnost TSO Comprehensive (EU) analize za identifikaciju NTRK1, NTRK2 ili NTRK3 fuzije pozitivnih pacijenata za lečenje larotrectinibom, kao i za procenu podudarnosti između TSO Comprehensive (EU) analize i metoda lokalnih analiza (LT) (koristi se za određivanje statusa NTRK fuzije za klinička ispitivanja larotrectiniba).

LT metode su uključivale NGS, fluorescentnu hibridizaciju in situ (FISH), lančanu reakciju polimeraze (PCR) i NanoString analize. NTRK fuzije (ETV6 NTRK3) su izvedene za pacijente sa infantilnim fibrosarkomom koji su imali dokumentovanu ETV6 translokaciju, koju je identifikovao FISH. Većina od 235 pacijenata koji su učestvovali u ispitivanju za larotrectinib sa poznatim statusom NTRK fuzije, testirana je NGS metodama.

Studije NAVIGATE NCT02576431 i SCOUT NCT02637687 nastavljaju sa uključivanjem. Od datuma preseka podataka 15. jula 2019. godine uključeno je 279 pacijenata. Od 279 pacijenata, 208 je bilo pozitivno na NTRK fuziju. Od 208 pozitivnih pacijenata, 164 je formiralo larotrectinib ePAS4.

Primarna krajnja tačka za analizu efikasnosti larotrectinib bila je ukupna stopa odgovora (ORR) prema proceni nezavisnog odbora za pregled (IRC) u zbirnom skupu podataka iz 3 kliničke studije. ORR je procenjena na osnovu udela pacijenata sa najboljim ukupnim odgovorom potvrđenog potpunog odgovora, ili potvrđenim delimičnim odgovorom na osnovu kriterijuma RECIST, verzija 1.1. ORR kod larotrectiniba ePAS4 bio je 72,6% (95% CI [65,1%, 79,2%]) i uključivao je pacijente sa 16 različitih tipova tumora.

Brojčani uzorak

Skup uzoraka predstavljao je široki spektar tipova tumora i uzoraka pedijatrijskih i odraslih pacijenata.

Bilo je 279 pacijenata uključenih u studije larotrectiniba od 15. jula 2019. godine. Od toga, 235 pacijenata je znalo status NTRK fuzije određen LT metodom: 208 je bilo pozitivno, a 27 je bilo negativno. Za 44 pacijenta, status NTRK fuzije nije bio poznat, jer testiranje nije bilo potrebno za podobnost pacijenta u fazama povećavanja doze za NCT02122913 i SCOUT NCT02637687 studije. Za TSO Comprehensive (EU) studiju kliničkog premošćavanja analize, uzorci pacijenata iz ispitivanja za larotrectinib koji su bili uključeni od 15. jula 2019. godine, sa poznatim statusom NTRK fuzije (208 pozitivnih pacijenata i 27 negativnih pacijenata) i dodatni uzorci za koje se utvrdi da su negativni na NTRK fuziju reprezentativnim LT metodama, bili su podobni za ovu studiju.

Od 208 pozitivnih uzoraka ispitivanja za larotrectinib, 154 je imalo uzorak dostupan za TSO Comprehensive (EU) testiranje analizom. Od toga, 138 je imalo važeće rezultate. Petnaest uzoraka je bilo nevažeće zbog neuspešnog pokazatelja kvaliteta sekvenciranja uzorka, a 1 uzorak nije testiran zbog odstupanja od protokola. Od 27 negativnih uzoraka ispitivanja za larotrectinib, 24 je imalo uzorak dostupan za testiranje. Od toga, 22 je imalo važeće TSO Comprehensive (EU) rezultate analize. Dva uzorka su bila nevažeća zbog neuspešnog pokazatelja kvaliteta sekvenciranja uzorka.

Dodatni uzorci su podvrgnuti skriningu primenom jedne od dve reprezentativne LT metode. Nabavljeno je i pregledano više od 350 uzoraka na sadržaj tumora. Od dopunskih uzoraka koji ispunjavaju zahteve za uzorak, 266 je uspešno ekstrahovano i potvrđeno je da je NTRK fuzija negativna reprezentativnom LT metodom. Od ovih uzoraka, 260 je bilo dostupno za TSO Comprehensive (EU) testiranje analizom, od kojih je 222 imalo važeće rezultate. Bilo je 38 uzoraka koji su bili nevažeći zbog neuspeha pokazatelja sekvenciranja uzorka (n = 25) ili neuspešnog sekvenciranja ciklusa (n = 13). Ukupan skup negativan na NTRK fuziju, sastojao se od 222 dodatna uzorka i 22 uzorka za ispitivanje larotrectiniba.

Rezultati podudarnosti

Poklapanje TSO Comprehensive (EU) rezultata u odnosu na rezultate LT metoda, sa nevažećim TSO Comprehensive (EU) rezultatima i bez njih, prikazano je u [Tabela 83](#).

Tabela 83 NTRK klinička studija premoščavanja: Podudarnost između TSO Comprehensive (EU) analize i LT metoda za detekciju NTRK fuzija

Merenje poklapanja	Isključujući nevažne rezultate TSO Comprehensive (EU) analize		Uključujući nevažne rezultate TSO Comprehensive (EU) analize	
	% poklapanja (n/N)	95% CI*	% poklapanja (n/N)	95% 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%

* Dvostrani intervali pouzdanosti od 95% izračunati su pomoću (egzaktne) Kloper-Pirson metode.

Analiza osetljivosti u odnosu na rezultate TSO Comprehensive (EU) analize koji nedostaju, pokazala je robusnost analize poklapanja. Rezultati TSO Comprehensive (EU) testa koji nedostaju za LT NTRK fuziju pozitivnih pacijenata (n = 70) pripisani su pomoću modela logističke regresije. Procene poklapanja, uključujući pripisane vrednosti, prikazani su u [Tabela 84](#).

Tabela 84 NTRK klinička studija premoščavanja: Podudarnost između TSO Comprehensive (EU) analize i LT metoda za detekciju NTRK fuzija uključujući pripisane vrednosti za LT pozitivne pacijente sa rezultatima TSO Comprehensive (EU) analize koji nedostaju

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

Rezultati TSO Comprehensive (EU) analize koji nedostaju za pacijente sa negativnom LT fuzijom nisu pripisani.

* Dvostrani 95% CI su izračunati na osnovu metode pokretanja višestruke imputacije. Metoda pokretanja višestruke imputacije je početni korak smešten unutar višestruke imputacije (Schomaker i Heumann 2018).

Poklapanja između TSO Comprehensive (EU) analize i LT prema tipu metode (na primer, RNK NGS, FISH) prikazana su u [Tabela 85](#).

Tabela 85 NTRK klinička studija premoščavanja: Podudarnost između TSO Comprehensive (EU) analize i LT metoda za detekciju NTRK fuzija prema LT tipu metode

LT tip metode	Merenje poklapanja	% poklapanja (n/N)	95% CI ¹
DNK 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%

LT tip metode	Merenje poklapanja	% poklapanja (n/N)	95% CI ¹
FISH	PPA	80,0% (8/10)	44,4% – 97,5%
	NPA	Nije izračunato (1/1)	Nije izračunato
	OPA	81,8% (9/11)	48,2% – 97,7%
PCR	PPA	100,0% (8/8)	63,1% – 100,0%
	NPA	Nije izračunato (0/0)	Nije izračunato
	OPA	100,0% (8/8)	63,1% – 100,0%

Nije izračunato: za podgrupe sa brojem uzorka < 5, statistika poklapanja nije izračunata.

¹ Dvostrani intervali pouzdanosti od 95% izračunati su pomoću (egzaktne) Kloper-Pirson metode.

² Obuhvata NGS metode koje koriste samo RNK, kao i DNK i RNK.

Od 437 uzoraka testiranih TSO Comprehensive (EU) analizom, 24 je imalo neskladne rezultate sa LT: 15 je bilo pozitivno od strane LT, a negativno od strane TSO Comprehensive (EU) analize, a 9 je bilo negativno od strane LT i pozitivno od strane TSO Comprehensive (EU) analize. Od 24 uzorka sa neskladnim rezultatima, 8 je testirano DNK NGS LT metodom, 14 RNK NGS LT metodom i 2 FISH metodom.

Potvrđena nezavisna NGS metoda potvrdila je TSO Comprehensive (EU) rezultate analize u 14 od 24 uzorka sa neskladnim rezultatima. Za preostalih 10 uzoraka, TSO Comprehensive (EU) rezultati analize su bili neskladni i sa LT i sa nezavisnom NGS metodom.

Rezultati kliničke efikasnosti

U okviru ePAS4 kohorte, efikasnost larotrectiniba u TSO Comprehensive (EU) pozitivnoj, LT pozitivnoj populaciji (97 pacijenata, ORR=78,4%, 95% CI [68,8%, 86,1%]) bila je slična efikasnosti larotrectiniba u ukupnoj ePAS4 populaciji (164 pacijenata, ORR=72,6%, 95% CI [65,1%, 79,2%]) (Tabela 86). Od 97 TSO Comprehensive (EU) pozitivnih pacijenata u ePAS4, 28 (28,9%) pacijenata je postiglo potpuni odgovor/hirurški potpuni odgovor, a 48 (49,5%) pacijenata je postiglo delimičan odgovor.

Od 13 TSO Comprehensive (EU) negativnih, LT pozitivna populacija, 1 (7,7%) je pokazao potpun odgovor, a 2 (15,4%) je pokazalo delimičan odgovor sa terapijom larotrectinibom.

Tabela 86 NTRK klinička studija premoščavanja: ORR za LT pozitivne pacijente po LT i TSO Comprehensive (EU) rezultati u ePAS4

		LT fuzija pozitivna N=164	TSO Comprehensive (EU) Pozitivno i LT pozitivno N=97	TSO Comprehensive (EU) Negativno i LT pozitivno N=13
Najbolji ukupni odgovor, n (%)	Potpuni odgovor	31 (18,9%)	22 (22,7%)	1 (7,7%)
	Hirurški potpuni odgovor	8 (4,9%)	6 (6,2%)	0
	Delimičan odgovor	80 (48,8%)	48 (49,5%)	2 (15,4%)
	Stabilna bolest	25 (15,2%)	13 (13,4%)	4 (30,8%)
	Progresivna bolest	13 (7,9%)	6 (6,2%)	5 (38,5%)
	Nije procenjivo	7 (4,3%)	2 (2,1%)	1 (7,7%)
Ukupna stopa odgovora	Broj pacijenata, n	164	97	13
	Broj pacijenata sa CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR% (95% CI*)	72,6% (65,1% 79,2%)	78,4% (68,8% 86,1%)	23,1% (5,0%, 53,8%)

Skraćenice: CR = potpuni odgovor, PR = delimični odgovor, sCR = hirurški potpuni odgovor.

* Dvostrani interval pouzdanosti od 95% izračunat je pomoću (egzaktne) Kloper-Pirson metode.

54 pacijenta nemaju TSO Comprehensive (EU) rezultate analize.

Podaci iz ove studije podržavaju bezbednost i efikasnost TSO Comprehensive (EU) analize, kada se koristi za identifikaciju pacijenata sa solidnim tumorima sa NTRK fuzijama, koji mogu biti podobni za lečenje larotrectinibom.

Reference

1. Američko društvo za kliničku onkologiju. www.asco.org. Pristupljeno 3. oktobra 2016.
2. Evropsko društvo za medicinsku onkologiju. www.esmo.org. Pristupljeno 3. oktobra 2016.

Istorija revizija

Revizija	Datum	Opis promene
v06	Februar 2023.	<ul style="list-style-type: none"> • Dodatne izjave u odeljku Ograničenja • Ažuriranja jezika radi konvencije, gramatike i jasnoće • Korekcija tabela 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72 • Izjava o prisustvu precipitata u FSM reagensu • Ažurirani ciklični termostat i najniže specifikacije na listi opreme i materijala
v05	Septembar 2022.	<ul style="list-style-type: none"> • Dodati TSO modul sveobuhvatne analize v2.3.5 PN • Uklonjen TSO modul sveobuhvatne analize v2.3.3 PN • Ažurirana terminologija u odeljku Granica praznog uzorka
v04	Jun 2022.	<ul style="list-style-type: none"> • Dodati TSO modul sveobuhvatne analize v2.3.5 PN • Uklonjen TSO modul sveobuhvatne analize v2.3.3 PN • Ažurirana terminologija u odeljku Granica praznog uzorka
v03	April 2022.	<ul style="list-style-type: none"> • Dodate informacije o karakteristikama performansi vezane za NTRK fuzije • Dodata oznaka SAMO ZA IZVOZ • Ažurirana izjava o predviđenoj nameni radi dodavanja zahteva NTRK1-3 CDx • Proširene informacije o komponentama proizvoda koje uključuju PN softverske komponente
v02	Februar 2022.	<ul style="list-style-type: none"> • Ispravljena greška referentne tabele • Dodato ograničenje vezano za zametne linije i somatske varijante • Razjašnjen jezik o detekciji amplifikacije gena
v01	Decembar 2021.	<ul style="list-style-type: none"> • Ažurirana ograničenja postupka • Razjašnjene specifikacije magnetnog postolja i cikličnog termostata u listama opreme i materijala
v00	Novembar 2021.	Inicijalno izdanje

Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj su u vlasništvu kompanije Illumina, Inc. i njenih podružnica („Illumina“) i namenjeni su isključivo za ugovorno korišćenje njenih kupaca u vezi sa korišćenjem proizvoda koji su ovde opisani i ni za šta drugo. Ovaj dokument i njegov sadržaj ne smeju se koristiti niti distribuirati ni za koju drugu svrhu niti se smeju prenositi, otkrivati ili reprodukovati ni na koji način bez prethodnog pisanog pristanka kompanije Illumina. Kompanija Illumina ne prenosi nikakvu licencu pod patentom, robnom markom, autorskim pravom ili javnim pravom niti sličnim pravima bilo kog trećeg lica prema ovom dokumentu.

Stručna i adekvatno obučena lica moraju strogo i izričito da poštuju uputstva u ovom dokumentu kako bi se obezbedila ispravna i bezbedna upotreba ovde opisanog(ih) proizvoda. Pre upotrebe tog(tih) proizvoda obavezno je u potpunosti pročitati i razumeti celokupnu sadržinu ovog dokumenta.

UKOLIKO NE PROČITATE I NE PRATITE OVO UPUTSTVO U CELOSTI TO MOŽE DA DOVEDE DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, POVREDA LICA, KAO ŠTO SU KORISNICI ILI DRUGA LICA, I OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE I TIME ĆE SE PONIŠTITI SVAKA GARANCIJA KOJA SE ODNOSI NA PROIZVOD.

KOMPANIJA ILLUMINA NE PREUZIMA NIKAKVU ODGOVORNOST USLED NEADEKVATNE UPOTREBE OVDE OPISANOG(IH) PROIZVODA (UKLJUČUJUĆI I NJIHOVE DELOVE ILI SOFTVER).

© 2023. Illumina, Inc. Sva prava zadržana.

Svi žigovi su vlasništvo kompanije Illumina, Inc. ili odgovarajućih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi www.illumina.com/company/legal.html.

Kontakt informacije



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 SAD
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (van Severne Amerike)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE

IVD



Oznake proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se pojavljuju na pakovanju i oznakama proizvoda potražite u legendi simbola na veb-sajtu support.illumina.com, na kartici *Dokumentacija* za vaš komplet.