

# TruSight Oncology Comprehensive (EU) illumina®

## Priložene upute

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIKU. SAMO ZA IZVOZ.

## Namjena

TruSight™ Oncology Comprehensive (EU) je *in vitro* dijagnostički test koji koristi ciljano sekvenciranje sljedeće generacije za otkrivanje varijanti u 517 gena uporabom nukleinskih kiselina ekstrahiranih iz uzoraka tumorskog tkiva fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin (FFPE) od bolesnika s rakom s čvrstim malignim neoplazmama primjenom instrumenta Illumina® NextSeq™ 550Dx. Test se može upotrebljavati za otkrivanje varijanti jednog nukleotida, varijanti više nukleotida, insercija, delecija i amplifikacija gena iz DNK-a te fuzija gena i varijanti spajanja iz RNK-a. Test također izvješćuje o rezultatu opterećenja tumora mutacijama (TMB) i statusu nestabilnosti mikrosatelita (MSI).

Test je namijenjen kao popratna dijagnostika za identifikaciju bolesnika s rakom za liječenje ciljnom terapijom navedenom u [Tablica 1](#), u skladu s odobrenim oznakama terapijskog proizvoda. Osim toga, test je namijenjen pružanju informacija o profiliranju tumora za uporabu od strane kvalificiranih zdravstvenih djelatnika u skladu sa stručnim smjernicama i nije konačan ili preskriptivan za označenu uporabu bilo kojeg specifičnog terapijskog proizvoda.

Tablica 1 Indikacija za popratnu dijagnostiku

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

# Sažetak i objašnjenje analize

## Klinički opis

Rak je vodeći uzrok smrti u svijetu i može potjecati iz bilo kojeg tkiva.<sup>1,2</sup> Analiza genetske osnove raka važna je za identifikaciju bolesnika koji mogu imati koristi od ciljanih terapija i za razvoj novih metoda liječenja. Brojni geni uključeni su u uzročnost ili progresiju raka, a mnoge vrste raka nose različite varijante koje utječu na te gene i njihove funkcije. Te varijante mogu uključivati mutacije gena kao što su varijante s jednim nukleotidom (SNV-ovi), varijante s više nukleotida (MNV-ovi), insercije ili delecije, amplifikacije gena, fuzije gena i varijante spajanja. Druga posljedica mutacija gena raka je predstavljanje neoantigena koji izazivaju imunološki odgovor specifičan za rak. Mutacijski status raka može predstavljati TMB i MSI, koji su genomski potpisi povezani s prezentacijom neoantigena raka.

TruSight Oncology Comprehensive je kvalitativni test sveobuhvatnog genomskog profiliranja (CGP) sljedeće generacije sekvenciranja (NGS) koji široko procjenjuje genomske varijante u velikom panelu gena povezanih s rakom navedenih u [Tablica 2](#). Analiza otkriva male varijante u 517 gena, plus amplifikacije gena, fuzije i varijante spajanja kako je navedeno u [Tablica 2](#). Analiza pruža pokrivenost sekvenci kodiranja za sve gene osim TERT-a, gdje je pokrivena samo regija promotora i procjenjuje TMB rezultat i MSI status. Ti ciljevi testa uključuju sadržaj koji navode profesionalne organizacije i druge glavne smjernice SAD-a. Neovisne publikacije konzorcija i farmaceutska istraživanja u kasnoj fazi također su utjecala na dizajn TSO Comprehensive analize.

Popis regija koje su isključene iz otkrivanja varijanti potražite na opsežnom popisu blokiranih *TruSight Oncology Comprehensive Block List (broj dokumenta 200009524)* dostupnom na web-mjestu za Illumina podršku. Popis blokiranih u nekim se datotekama naziva crni popis.

U [Tablica 2](#) identificirane su četiri kategorije vrsta varijanti: Mala DNK varijanta (S), amplifikacija gena (A), fuzija (F) i varijanta spajanja (Sp). Male varijante DNK-a uključuju SNV-ove, MNV-ove te insercije i delecije.

Tablica 2 TSO Comprehensive (EU) Panel gena za analizu

Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta 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	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta 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

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

Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
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

Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRF1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
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

Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante	Br.	Entrez ID	Gen	Vrsta varijante
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo

# Načela postupka

TSO Comprehensive (EU) analiza je distribuirani test koji se provodi ručno primjenom ekstrahirane nukleinske kiseline kao ulaznog materijala. DNK i/ili RNK ekstrahirani iz tkiva fiksiranog u formalinu i umetnutog u parafin (FFPE) koriste se za pripremu biblioteka koje se zatim obogaćuju za gene-povezane s rakom i sekvenciraju na Instrument NextSeq 550Dx.

TSO Comprehensive (EU) analiza uključuje sljedeće postupke.

- **Priprema i obogaćivanje biblioteka** – za RNK ukupno 40 ng pretvara se u dvolančani komplementarni DNK (cDNK). Za genomski DNK (gDNK), 40 ng gDNK-a cijepa se u male fragmente. Univerzalni adapteri za sekvenciranje ligiraju se na fragmente cDNK-a i gDNK-a. Sekvence adaptera P5 i P7 ugrađene su u svaku biblioteku kako bi se omogućilo hvatanje fragmenata biblioteka na površinu protočne stanice tijekom sekvenciranja. Adapteri uključuju sekvence indeksa i5 i i7 za identifikaciju svakog pojedinačnog uzorka i, u slučaju biblioteka iz uzoraka gDNK-a, individualne molekule uz uporabu jedinstvenih molekularnih identifikatora (UMI). Biblioteka se zatim obogaćuju za specifične gene od interesa pomoću metode temeljene na hvatanju. Sekvence biotinizirane sonde koje obuhvaćaju genske regije od interesa ciljane testom hibridizirane su bibliotekama. Sonde i hibridizirane ciljane biblioteka izolirane su od neciljanih biblioteka hvatanjem pomoću magnetnih čestica streptavidina. Ciljane obogaćene biblioteka oprane su i amplificirane. Količina svake obogaćene biblioteka zatim se normalizira metodom temeljenom na zrcima kako bi se osigurala jednaka zastupljenost u objedinjenim bibliotekama za sekvenciranje.
- **Sekvenciranje i primarna analiza** – Normalizirane, obogaćene biblioteka objedinjavaju se i grupiraju na protočnoj stanici, a zatim se sekvenciraju kemijskim postupkom sekvenciranja sintezom (SBS) na NextSeq 550Dx. Kemijski postupak SBS upotrebljava metodu reverzibilnog terminatora za otkrivanje fluorescentno označenih deoksinukleotid trifosfat (dNTP) baza dok se oni ugrađuju u rastuće lance DNK-a. Tijekom svakog ciklusa sekvenciranja, jedan dNTP dodaje se lancu nukleinske kiseline. Oznaka dNTP služi kao terminator za polimerizaciju. Nakon svakog ugrađivanja dNTP-a, fluorescentna boja se snima kako bi se identificirala baza, a zatim cijepa kako bi se omogućilo uključivanje sljedećeg nukleotida. Četiri reverzibilna dNTP-a povezana s terminatorom (A, G, T i C) prisutna su kao pojedinačne, zasebne molekule. Kao rezultat toga, prirodna konkurencija smanjuje pristranost ugrađivanja. Tijekom primarne analize, otkrivanje baza obavlja se izravno iz mjerenja intenziteta signala tijekom svakog ciklusa sekvenciranja, što rezultira sekvenciranjem baze-po-baze. Rezultat kvalitete dodjeljuje se svakom otkrivanju baze.
- **Sekundarna analiza** – Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) nalazi se na instrumentu NextSeq 550Dx kao dio Local Run Manager softvera kako bi se olakšalo postavljanje TSO Comprehensive (EU) obrade i provela sekundarna analiza rezultata sekvenciranja. Sekundarna analiza uključuje utvrđivanje valjanosti izvođenja obrade i kontrole kvalitete, nakon čega slijedi demultipleksiranje, generiranje datoteke FASTQ, poravnanje i otkrivanje varijanti. Demultipleksiranje odvaja podatke iz objedinjenih biblioteka na temelju jedinstvenih indeksa sekvenciranja koji su dodani tijekom postupka pripreme biblioteka. Generiraju se međudatoteke FASTQ koje sadrže očitavanja sekvenciranja za svaki uzorak i rezultate kvalitete, osim očitavanja iz klastera koja nisu prošla filter. Očitavanja sekvenciranja zatim se usklađuju s referentnim genomom kako bi se identificirao odnos između sekvenci i dodjeljuje im se rezultat na temelju



područja sličnosti. Usklađena očitavanja zapisuju se u datoteke u formatu BAM. Softver za analizu koristi odvojene algoritme za biblioteke generirane iz uzoraka DNK-a i/ili RNK-a kako bi otkrio male varijante DNK-a, amplifikacije gena, TMB i MSI za uzorke DNK-a te fuzije i varijante spajanja za uzorke RNK-a. Višestruki izlazi generiraju se modulom softvera za analizu, uključujući mjerne podatke sekvenciranja i datoteke Formata za otkrivanje varijanti (VCF). Datoteke VCF sadrže informacije o varijantama pronađenim na određenim mjestima u referentnom genomu. Mjerni podaci sekvenciranja i pojedinačne izlazne datoteke generiraju se za svaki uzorak. Pogledajte dokument *Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (broj dokumenta 200008661)* za pojedinosti o sekundarnoj i tercijarnoj analizi.

- **Tercijarna analiza** – Tercijarna analiza koju provodi Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) sastoji se od TMB i MSI izračuna, otkrivanja popratnom dijagnostikom, profiliranja tumora varijanti u dvije razine kliničkog značaja pomoću baze znanja (KB) i vrste tkiva te generiranja izvješća o rezultatima. Profiliranje tumora također se naziva sveobuhvatnim genomskim profiliranjem. Interpretirani rezultati varijanti, kao i rezultati TMB i MSI biomarkera, sažeti su u TSO Comprehensive (EU) izvješću o rezultatima.

## Ograničenja postupka

### Samo za *in vitro* dijagnostiku.

- Za uporabu samo na recept. Test se mora koristiti u skladu s propisima kliničkog laboratorija.
- Genomski nalazi navedeni u [Tablica 2](#) namjene nisu preskriptivni ni konačni za označenu namjenu bilo kojeg specifičnog terapijskog proizvoda.
- Za varijante navedene u TSO Comprehensive (EU) izvješću o rezultatima u okviru Genomskih nalaza s dokazima kliničkog značaja (razina 2) i Genomskih nalaza s potencijalnim kliničkim značajem (razina 3), nije provedeno kliničko utvrđivanje valjanosti.
- Odluke o skrbi i liječenju bolesnika moraju se temeljiti na neovisnoj medicinskoj prosudbi nadležnog liječnika, uzimajući u obzir sve primjenjive informacije o stanju bolesnika, kao što su anamneza bolesnika i obiteljska anamneza, liječnički pregledi, informacije iz drugih dijagnostičkih testova i želje bolesnika, u skladu sa standardom skrbi u određenoj zajednici.
- Kvaliteta FFPE uzorka vrlo je promjenjiva. Uzorci koji nisu prošli standardne postupke fiksiranja možda neće generirati ekstrahirane nukleinske kiseline koje zadovoljavaju zahtjeve kontrole kvalitete analize ([Kontrola kvalitete na stranici 81](#)). FFPE blokovi koji su pohranjeni dulje od pet godina pokazali su nižu valjanost.
- Učinkovitost TSO Comprehensive (EU) u uzoraka dobivenih od bolesnika koji su imali transplantaciju organa ili tkiva nije procijenjena.
- Visoka količina nekrotičnog tkiva ( $\geq 25\%$ ) može ometati sposobnost TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje amplifikacije gena i fuzija RNK-a.
- Pokretačke somatske mutacije možda neće biti pouzdano otkrivene ako je sadržaj tumora (po području) manji od 20 %.
- Status MSI-visok (MSI-H) možda neće biti pouzdano otkriven ako je sadržaj tumora manji od 30 %.

- Hemoglobin povezan s tkivom smanjuje potporna očitavanja za varijante MET spajanja.
- Kod visoko preuređenih genoma s delecijama i gubitkom heterozigoznosti, TSO Comprehensive (EU) softver može pogrešno klasificirati uzorak DNK-a kao kontaminiran (CONTAMINATION\_SCORE > 3106 i p-vrijednost > 0,049).
- Negativan rezultat ne isključuje prisutnost mutacije ispod granica otkrivanja (LoD-a) analize.
- Na osjetljivost za otkrivanje malih varijanti DNK-a može utjecati na:
  - Genomski kontekst niske složenosti.
  - Povećanje duljine varijante.
- TMB rezultati mogu biti netočni u sljedećim kontekstima:
  - Kako sadržaj tumora doseže razine u kojima se konvergiraju učestalosti zametnih i somatskih varijanti alela (VAF-ovi).
  - U populacijama koje nisu dobro zastupljene u javnim bazama podataka.
- Amplifikacije gena jedine su varijante broja kopija koje je prijavio TSO Comprehensive (EU). Analiza ne prijavljuje delecije gena.
- Algoritmi otkrivanja fuzija u TSO Comprehensive (EU) softveru za analizu možda neće uzeti u obzir dokaze iz očitavanja koja se protežu izvan zabilježenih granica gena.
- Na osjetljivost za otkrivanje fuzija može utjecati:
  - Niska složenost biblioteke koja rezultira smanjenim potpornim očitavanjima zbog odstupanja u tijeku rada analize (na primjer, slijedite korake za miješanje u [Denaturirajte i zagrijte RNK na stranici 45](#)).
  - Kada jedan gen obuhvaća obje točke prekida.
  - U slučajevima kada je nekoliko fuzijskih točaka prekida u neposrednoj blizini jedne s drugom ili više partnera, višestruke točke prekida i partneri mogu se prijaviti kao jedna točka prekida i partner.
  - Male srednje veličine umetka. Potrebna je minimalna srednja veličina umetka od 80 bp, ali se osjetljivost smanjuje u rasponu od 80 do 100 bp.
  - Niska složenost sekvence ili homolognog genomskog konteksta oko točaka prekida fuzije.
- Na rezoluciju gena uključenih u fuziju može utjecati kada se fuzijske točke prekida pojave u genomskim područjima koja sadrže preklapajuće gene. Analiza će izvijestiti o svim genima, odvojeno točkom i zarezom, ako više gena preklapa točku prekida.
- Nedosljedna pokrivenost u TERT regiji promotora može rezultirati s „Nema rezultata” zbog niske dubine.
- Pogreške u označivanju ili KB-u mogu uzrokovati lažno pozitivan ili lažno negativan rezultat, uključujući navođenje varijante na pogrešnoj razini (između Genomskih nalaza s dokazima kliničkog značaja (razina 2) i Genomskih nalaza s potencijalnim kliničkim značajem (razina 3)) ili bi informacije o označivanju u izvješću mogle biti netočne. Mogućnost pogreške postoji iz sljedeća tri izvora:
  - TSO Comprehensive (EU) označivanje varijanti. Postoji stopa pogreške od približno 0,0027 % temeljena na analizi 2.448.350 varijanti iz COSMIC v92, stoga postoji mala mogućnost pogreške.
  - Pogreška KB-a zbog postupka kuriranja ili razvrstavanja.

- Važnost sadržaja KB-a mijenja se tijekom vremena. Izvješće odražava znanje u vrijeme kada je KB verzija kurirana.
- TSO Comprehensive (EU) je dizajniran za prijavu somatskih varijanti prilikom prijavljivanja varijanti s dokazima od kliničkog značaja ili varijanti s potencijalnim kliničkim značajem. Kao test samo za tumor, moguće je izvješćivanje o varijanti zametnih stanica (naslijeđeno), ali nenamjerno. TSO Comprehensive (EU) koristi KB za izvješćivanje o varijantama bez izričitog označavanja jesu li zametnog ili somatskog podrijetla.
- KB uključuje samo terapijska, dijagnostička i prognostička povezivanja koja su relevantna za varijante prisutne u utvrđenoj čvrstoj malignoj neoplazmi. U KB nisu uključena povezivanja s osjetljivošću ili rizikom od raka.
- Sljedeća tablica prikazuje promjene nukleotida za tri RET varijante koje analiza ne može otkriti. Mogu se otkriti i druge nukleotidne promjene za istu promjenu aminokiseline.

Tablica 3 Promjene nukleotida za tri RET varijante

Promjena aminokiseline	Kr	Položaj	Referentni alel	Alternativa
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA CAAAGAGA CAAAAAGG CCAAAAGG CTAAGAGG

Chr = kromosom

## Komponente proizvoda

TSO Comprehensive (EU) test sastoji se od sljedećih komponenti:

- TruSight Oncology Comprehensive (EU) komplet (Illumina kataloški broj 20063092) – Komplet uključuje reagense s dovoljnim volumenom za generiranje 24 DNK i 24 RNK biblioteke. To uključuje uzorke i kontrole bolesnika. Kontrole se prodaju zasebno (pogledajte odjeljak [Obavezni reagensi koji nisu priloženi na stranici 18](#)).
- Baza znanja: Redovito se ažurira i dostupna je za preuzimanje na portalu Lighthouse tvrtke Illumina.
- Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illumina kataloški broj 20051843\*), koji uključuje sljedeće komponente i podržava profiliranje tumora i NTRK:
  - Paketi zahtjeva TSO Comprehensive (EU) v2.3.0 (PN 20109338)
  - TSO Comprehensive (EU) v2.3.7 Softverski paket (PN 20116450)
  - TSO Comprehensive (EU) v2.3.7 + Paketi zahtjeva TSO Comprehensive (EU) v2.3.0 USB komplet (PN 20116451)
- Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (Illumina kataloški broj 20051843\*), koji uključuje sljedeće komponente i podržava profiliranje tumora i NTRK:
  - Paketi zahtjeva TSO Comprehensive (EU) v2.0.0 (PN 20051760)
  - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 Softverski paket (PN 20075244)
  - TSO Comprehensive (EU) v2.3.5 USB komplet (PN 20075239)

\* Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU): Illumina servisni predstavnik instalira odgovarajuću verziju sustava Modul za analizu TSO Comprehensive (EU) na Local Run Manager Instrument NextSeq 550Dx. Pogledajte odjeljak [Tablica 4](#) Vodič za tijek rada i inačicu softvera modula za analizu.

Tablica 4 Vodič za tijek rada za verziju softvera modula za analizu TSO Comprehensive

Vodič za tijek rada	Tkivo	Verzija softvera TSO Comprehensive
200008661	FFPE	v2.3.5 ili v2.3.7

# Reagensi

## Priloženi reagensi

Uz TSO Comprehensive (EU) komplet isporučuju se sljedeći reagensi.

### TruSight Oncology Comp RNA Library Prep, PN 20031127

Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli i nukleotide	od -25 °C do -15 °C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli, DNA polymerase, RNazu H i nukleotide	od -25 °C do -15 °C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli i nasumične heksamere	od -25 °C do -15 °C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži reverse transcriptase	od -25 °C do -15 °C

### TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznuto), PN 20031118

Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži T4 DNA polymerase i polinukleotidnu kinazu	od -25 °C do -15 °C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli i nukleotide	od -25 °C do -15 °C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1,73 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli	od -25 °C do -15 °C

Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži ligazu	od -25 °C do -15 °C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži univerzalne oligonukleotide sekvenciranja	od -25 °C do -15 °C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži univerzalne oligonukleotide sekvenciranja	od -25 °C do -15 °C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli	od -25 °C do -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži DNA polymerase i nukleotide	od -25 °C do -15 °C

### TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno), PN 20031119

Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli	2 °C do 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodena otopina koja sadrži magnetna zrnca	2 °C do 8 °C
TE Buffer (TEB)	20031443	1	10 ml	Tris EDTA otopina	2 °C do 8 °C

**TruSight Oncology Comp UP Index Primers, PN 20031120**

Aktivni sastojci: Puferirana vodena otopina koja sadrži oligonukleotidne početnice s pojedinačnim crtičnim kodom.

**OPREZ**

Koristite jedinstvene početnice za indeksiranje (UPxx) za uzorke RNK-a ili DNK-a. Nemojte kombinirati početnice CPxx i UPxx indeksa zajedno u istoj biblioteci.

Početnice za indeksiranje	Broj dijela	Količina	Volumen	i7 indeks	Sekvenca i7	i5 indeks	Sekvenca i5	Temperatura skladištenja
UP01	20031445	1	24 µl	D702	TCCGGA	D503	AGGATAGG	od -25 °C do -15 °C
UP02	20031446	1	24 µl	D707	CTGAAGCT	D504	TCAGCC	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	GAATC	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 Index Primers, PN 20031126**

Aktivni sastojci: Puferirana vodena otopina koja sadrži oligonukleotidne početnice s pojedinačnim crtičnim kodom.

**OPREZ**

Koristite kombinatorne početnice za indeksiranje (CPxx) samo za uzorke DNK-a. Nemojte kombinirati početnice CPxx i UPxx indeksa zajedno u istoj biblioteci.

Početnice za indeksiranje	Broj dijela	Količina	Volumen	i7 indeks	Sekvenciranje	i5 indeks	Sekvenciranje	Temperatura skladištenja
CP01	20031461	1	20 µl	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCTCG	od -25 °C do -15 °C

Početak za indeksiranje	Broj dijela	Količina	Volumen	i7 indeks	Sekvenciranje	i5 indeks	Sekvenciranje	Temperatura skladištenja
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	TCGCGC	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
CP07	20031467	1	20 µl	D711	TCGCGC	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	TCGCGC	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	TCGCGC	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), PN 20031123

Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži formamid i soli	2 °C do 8 °C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7,78 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli i čvrsta fazna paramagnetna zrnca kovalentno obložena streptavidinom	2 °C do 8 °C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µl	Otopina natrijevog hidroksida	2 °C do 8 °C



Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µl	Puferirana vodena otopina	2 °C do 8 °C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1,04 ml	Puferirana otopina koja sadrži paramagnetna zrnca u krutoj fazi	2 °C do 8 °C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4,8 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli, 2-merkaptotanol i formamid	2 °C do 8 °C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3,5 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli	2 °C do 8 °C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12,4 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli	2 °C do 8 °C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6,11 ml	Vodena otopina koja sadrži magnetna zrnca	2 °C do 8 °C

### TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto), PN 20031121

Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži oligonukleotide	od -25 °C do -15 °C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50,4 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli	od -25 °C do -15 °C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1,65 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži deterdžent	od -25 °C do -15 °C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži DNA polymerase i nukleotide	od -25 °C do -15 °C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži početnice P5 i P7	od -25 °C do -15 °C

Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4,6 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži soli, 2-merkaptetoetanol i formamid	od -25 °C do -15 °C
PhiX Internal Control (PX3 ili PhiX)	20031492	1	10 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži genomski DNK PhiX	od -25 °C do -15 °C

## TruSight Oncology Comp Content Set, PN 20031122

Reagens	Broj dijela	Količina	Volumen	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µl	Skup oligonukleotidne sonde	od -25 °C do -15 °C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µl	Skup oligonukleotidne sonde	od -25 °C do -15 °C

## Obavezni reagensi koji nisu priloženi

### Reagensi za predamplifikaciju

- DNA and RNA extraction and purification reagents (reagensi za ekstrakciju i pročišćavanje DNK-a i RNK-a) – Zahtjeve za reagense potražite u odjeljku [Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27](#).
- DNA and RNA quantification reagents (reagensi za kvantificiranje DNK-a i RNK-a) – Zahtjeve za reagense potražite u odjeljku [Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27](#).
- TruSight Oncology Kontrole:
  - TruSight Oncology DNK kontrola (Illumina kataloški broj 20065041)
  - TruSight Oncology RNK kontrola (Illumina kataloški broj 20065042)
- Etanol (EtOH) 100-postotni (razine 200), kvalitete za uporabu u molekularnoj biologiji.
- RNase/DNase-free water.

### Reagensi za postamplifikaciju

- NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa), (Illuminakataloški broj 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)
- Etanol (EtOH) 100-postotni (razine 200), kvalitete za uporabu u molekularnoj biologiji
- RNase/DNase-free water

## Pohrana i rukovanje reagensima

Reagensi u sljedećim kutijama isporučuju se zamrznuti. Pohranite na temperaturi od -25 °C do -15 °C.

Kutija	Broj dijela	Područje laboratorija
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep	20031127	Predamplifikacija
TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznuto)	20031118	Predamplifikacija
TruSight Oncology Comp UP Index Primers	20031120	Predamplifikacija
TruSight Oncology Comp CP Index Primers	20031126	Predamplifikacija
TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto)	20031121	Postamplifikacija
TruSight Oncology Comp Content Set	20031122	Postamplifikacija



### OPREZ

Nemojte pohranjivati reagense u jedinici za pohranu bez zamrzavanja ili u odjeljcima vrata hladnjaka.

Sljedeći reagensi u kutijama isporučuju se na pakiranjima s gelom radi održavanja temperature od 0 °C do 10 °C. Pohraniti na temperaturi od 2 °C do 8 °C.

Kutija	Broj dijela	Područje laboratorija
TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno)	20031119	Predamplifikacija
TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno)	20031123	Postamplifikacija



### OPREZ

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

- Promjene u fizičkom izgledu reagensa mogu upućivati na oštećenje materijala. Ako se primijete promjene u fizičkom izgledu (npr. očite promjene boje reagensa ili vidljiva zamućenost), nemojte upotrebljavati reagense.
- FSM, SSM, ERA1-B i TCB1 mogu imati čestice povezane s proizvodom. Slijedite specifične smjernice za rukovanje za svaki reagens. Nakon provođenja FSM i SSM koraka miješanja, preostale bijele čestice povezane s proizvodom neće utjecati na učinkovitost.

- Stabilnost TSO Comprehensive (EU) analize procijenjena je i prikazana je učinkovitost za do četiri primjene kompleta. Reagensi su stabilni kad se skladište na navedenim temperaturama do datuma isteka roka trajanja navedenog na naljepnicama na kutijama.

# Oprema i materijali

## Obavezna oprema i materijal koji nisu priloženi

### Oprema i materijali za predamplifikaciju

Oprema	Dobavljač
Ultrazvučni uređaj s pripadajućim dodacima Pogledajte odjeljak <a href="#">Postavke konfiguracije ultrazvučnog uređaja za fragmentaciju DNK-a na stranici 25</a> .	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Ciklički termostat sljedećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> <li>Grijani poklopac koji se može postaviti na 30 °C i 100 °C (ili isključiti ako ne postoji mogućnost od 30 °C)</li> <li>Obuhvaća temperaturni raspon od 4 °C do 99 °C</li> <li>Temperaturna preciznost ± 0,25 °C</li> <li>Kompatibilan s PCR pločicama s 96 jažica, 0,2 ml</li> <li>Pogledajte odjeljak <a href="#">Stopa pojačavanja termociklera na stranici 26</a></li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrtložna miješalica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Inkubator za mikrouzorke (2) s umetcima za MIDI pločice s 96 jažica (2)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Mikrocentrifuga	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Centrifugirajte (centrifuga pločice) sa sljedećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifugiranje mikropločica s 96 jažica</li> <li>280 × g</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vibracijski uređaj za pločicu sa sljedećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> <li>Orbita od 2 mm</li> <li>Može tresti pri 1200 o/min i 1800 o/min</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Brtveni klin ili valjak	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Magnetni stalak sa sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> <li>Dizajniran za taloženje/separaciju paramagnetnih zrnaca</li> <li>Magneti na bočnoj strani stalka, a ne na dnu</li> <li>Za MIDI pločice s 96 jažica</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Oprema	Dobavljač
<p>Precizne pipete koje mogu precizno isporučiti volumene od 2 µl do 1000 µl sljedećih specifikacija:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Jednokanalna ili višekanalna pipeta s povećanjem od 0,02 ml</li> <li>Jednokanalna ili višekanalna pipeta s povećanjem od 0,1 ml, 0,2 ml ili 0,5 ml</li> <li>Jednokanalna ili višekanalna pipeta s povećanjem od 1 µl ili 2 µl</li> </ul> <p>Pipete se moraju kalibrirati redovito i precizno unutar 5 % navedenog volumena.</p>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Držać za pipete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Zamrznuti ili hladni blok	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 10 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
<p>Pločica s 96 jažica i sljedećim specifikacijama:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Može se odlijepiti</li> <li>Prikladno za PCR pločice punog profila ili s poluzaštitom</li> <li>Jako ljepilo koje podnosi višestruke promjene temperature od -20 °C do 100 °C</li> <li>Bez DNaze/RNaze</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Epruvete za mikrocentrifugu od 1,7 ml, bez nukleaze	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Spremnici za reagense bez nukleaze (jednokratno korito, 50 ml) (ili ekvivalent)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Stožaste epruvete od 15 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Konusne epruvete od 50 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipeta otpornih na aerosol	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Pločice za pohranu s 96 jažica, 0,8 ml (MIDI pločice)	Fisher Scientific, broj dijela AB-0859 ili ekvivalent
PCR pločice s 96 jažica, 0,2 ml (polipropilen)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

## Oprema i materijali za postamplifikaciju

Oprema	Dobavljač
Instrument NextSeq 550Dx	illumina, kataloški broj 20005715
Centrifugirajte (centrifuga pločice) sa sljedećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> <li>Centrifugiranje mikropločica s 96 jažica</li> <li>280 × g</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Ciklički termostat sljedećih specifikacija: <ul style="list-style-type: none"> <li>Zagrijani poklopac (100 °C)</li> <li>Obuhvaća temperaturni raspon od 4 °C do 99 °C</li> <li>Temperaturna preciznost ± 0,25 °C</li> <li>Kompatibilan s PCR pločicama s 96 jažica, 0,2 ml</li> <li>Pogledajte odjeljak <a href="#">Stopa pojačavanja termociklera na stranici 26</a></li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrtložna miješalica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Inkubator za mikrouzorke s umetcima za MIDI pločice s 96 jažica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Suhi toplinski blok sa sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> <li>Temperaturni raspon od 25 °C do 99 °C</li> <li>Temperaturna preciznost ± 5 °C</li> <li>Provjerite jesu li epruvete za mikrocentrifugu kompatibilne s toplinskim blokom</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vibracijski uređaj za pločicu sa sljedećim mogućnostima: <ul style="list-style-type: none"> <li>Orbita od 2 mm</li> <li>Može tresti pri 1200 o/min i 1800 o/min</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Mikrocentrifuga	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Brtveni klin ili valjak	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Magnetni stalak sa sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> <li>Dizajniran za taloženje/separaciju paramagnetnih zrnaca</li> <li>Magneti na bočnoj strani stalka, a ne na dnu</li> <li>Za MIDI pločice s 96 jažica</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Oprema	Dobavljač
<p>Precizne pipete sa sljedećim specifikacijama:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Jednokanalna ili višekanalna pipeta s povećanjem od 0,02 ml</li> <li>Jednokanalna ili višekanalna pipeta s povećanjem od 0,1 ml, 0,2 ml ili 0,5 ml</li> <li>Jednokanalna ili višekanalna pipeta s povećanjem od 1 µl ili 2 µl</li> </ul> <p>Pipete se moraju kalibrirati redovito i precizno unutar 5 % navedenog volumena.</p>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Držać za pipete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 10 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
<p>Pločica s 96 jažica i sljedećim specifikacijama:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Može se odlijepiti</li> <li>Prikladno za PCR pločice punog profila ili s poluzaštitom</li> <li>Jako ljepilo koje podnosi višestruke promjene temperature od -20 °C do 100 °C</li> <li>Bez DNaze/RNaze</li> </ul>	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Epruvete za mikrocentrifugu od 2 ml, bez nukleaze	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Epruvete za mikrocentrifugu, bez nukleaze	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Spremnici za reagense bez nukleaze (jednokratno korito, 50 ml) (ili ekvivalent)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Stožaste epruvete od 15 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Konusne epruvete od 50 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Kompatibilni vrhovi pipeta otporni na aerosol	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Pločice za pohranu s 96 jažica, 0,8 ml (MIDI pločice)	Fisher Scientific, broj dijela AB-0859 ili ekvivalent
PCR pločice s 96 jažica kompatibilne s termociklerom, 0,2 ml (jažice od polipropilena)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Led ili hladni blok	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora



## Postavke konfiguracije ultrazvučnog uređaja za fragmentaciju DNK-a

Fragmentacija DNK-a ili cijepanje utječe na učinkovitost analize određivanjem raspodjele veličine fragmenta, što zauzvrat utječe na pokrivenost sekvenciranjem. Procijenjeno je i optimizirano nekoliko konfiguracija usmjerene ultrazvučne obrade za TSO Comprehensive (EU) analizu ([Tablica 5](#)).

- Vrijeme cijepanja prilagođeno je kako bi se maksimizirali mjerni podaci MEDIAN\_EXON\_COVERAGE navedeni u [Kontrola kvalitete na stranici 81](#). Vrijeme cijepanja (pogledajte [Tablica 5](#)) i rezultati MEDIAN\_INSERT\_SIZE razlikovali su se po konfiguracijama.
- Konfiguracije 1 – 4 testirane su sa staklenim epruvetama s 8 traka, dok je konfiguracija 5 koristila jednu staklenu epruvetu. Kapaciteti volumena epruvete prikazani su u [Tablica 5](#).
- Optimizacija konfiguracija 3, 4 i 5 (manji volumen vodene kupelji) koristila je pulsiranje i bile su razdijeljene cijepanjem u epruvete manjeg volumena. Kapaciteti volumena epruvete utječu na parametre cijepanja.
- Konfiguracija 4 (linijski pretvornik, volumen srednje veličine vodene kupelji, degazirana voda) zahtijevala je vrijeme odgode dugog pulsa (40 sekundi) za postizanje sličnog MEDIAN\_EXON\_COVERAGE kao konfiguracije 1 i 2 pri nominalnom ulazu od 40 ng.
- Optimalne postavke za konfiguraciju 3 rezultirale su nešto većom raspodjelom veličine fragmenata u usporedbi s ostalim konfiguracijama (MEDIAN\_INSERT\_SIZE bio je otprilike 5 – 10 parova baza veći).
- Konfiguracije 3 i 5 koristile su vodu koja nije degazirana i najmanje veličine vodene kupelji te su zahtijevale povećani ulaz DNK-a (50 ng za konfiguraciju 3, 60 ng za konfiguraciju 5) kako bi se postigao sličan MEDIAN\_EXON\_COVERAGE u odnosu na ostale 3 konfiguracije, koje su koristile nominalni ulaz od 40 ng.
- Konfiguracija 3 i 5 imaju više oštećenja i/ili denaturacije te stoga smanjenu učinkovitu masu korisnih molekula dsDNK-a za pripremu biblioteke.

Centrifugirajte epruvete za cijepanje tijekom postupka oporavka kako biste osigurali da je navedeni volumen preuzet jer svaki gubitak materijala može negativno utjecati na učinkovitost.

Tablica 5 Procijenjene konfiguracije usmjerene ultrazvučne obrade

Parametar	Konfiguracija				
	1	2	3	4	5
Pretvornik	Linija	Točka	Točka	Linija	Točka
Volumen vodene kupelji	5 l	5 l	85 ml	500 ml	16 ml
Degazirana voda	Da	Da	Ne	Da	Ne
Hladnjak vode	Da	Da	Da	Da	Da
Temperatura vodene kupelji	7 °C	7 °C	12 °C	12 °C	20 °C
Vršna snaga incidenta (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W
% faktora opterećenja	30	10	30	25	20
Ciklusi po rasprsnuću	200	200	1000	1000	1000
Pulsiranje (10 sek. rasprsnuća)	Ne	Ne	Da	Da	Da
Vrijeme odgode pulsiranja	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	10 s	40 s	10 s
Vrijeme cijepanja	250 s	280 s	200 s <sup>1</sup>	320 s <sup>2</sup>	200 s <sup>1</sup>
Obrada uzorka	1 – 8	1	1	1 – 8	1
Veličina serije	1 – 96	1 – 96	1 – 8	1 – 8	1
Veličina uzorka staklene epruvete s 8 traka	130 µl	130 µl	50 µl	50 µl	Jedna epruveta (50 µl)
Ekvivalent ulaza DNK-a (za srednju pokrivenost egzona)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng

\* Vrijeme cijepanja od 200 sekundi sastoji se od 10 sekundi rasprsnuća s 20 ponavljanja.

\* Vrijeme cijepanja od 320 sekundi sastoji se od 10 sekundi rasprsnuća s 32 ponavljanja.

## Stopa pojačavanja termociklera

Stopa pojačavanja termociklera utječe na mjerne podatke QC analize (upotrebljiva MSI lokacija, medijan broja spremnika CNV cilja, medijan veličine umetka (RNK)) i na popratna očitavanja za varijante spajanja i fuzija. Preporučuje se optimizacija stope pojačavanja termociklera. Na primjer, testirani model prilagođen je sa zadanom (i maksimalnom) stopom pojačavanja od 5 °C/s do 3 °C/s kako bi se dobili usporedivi rezultati s drugim modelima s nižim zadanim stopama pojačavanja.

# Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka

Slijedite standardni postupak prilikom prikupljanja, transporta, pohrane i obrade uzoraka.

## Zahtjevi za uzorke

### FFPE tkivo

TSO Comprehensive (EU) analiza zahtijeva 40 ng RNK-a i/ili 40 ng DNK-a ekstrahiranog iz FFPE tkiva. Korištenje RNK-a i DNK-a omogućuje analizu svih navedenih vrsta varijanti. Tkivo treba učvrstiti uporabom formalinskog fiksatora prikladnog za molekularne analize (na primjer, 10-postotnog neutralnog puferiranog formalina). Tkivo se ne smije dekalificirati. Prije provođenja TSO Comprehensive (EU) analize, uzorak tkiva treba pregledati patolog kako bi se osiguralo da je prikladan za ovu pretragu. Potrebno je najmanje 20 % sadržaja tumora (po području) za otkrivanje pokretačkih somatskih mutacija. Pouzdano otkrivanje MSI statusa u raznim uzorcima zahtijeva najmanje 30 % sadržaja tumora. Ako se uzorak testira s manje od 30 % sadržaja tumora radi utvrđivanja ishoda s drugim vrstama varijanti, rezultat MSS-a može biti nepouzdan. Rezultat MSI-H-a točan je bez obzira na sadržaj tumora.

Sadržaj tumora za amplifikacije gena i varijante RNK-a ovisi o opsegu amplifikacije ili ekspresiji fuzije (pogledajte [Sadržaj tumora na stranici 102](#)).

Za veliku vjerojatnost izdvajanja RNK-a od 40 ng i DNK-a od 40 ng iz različitih vrsta čvrstih tkiva, preporučeni volumen tkiva iznosi  $\geq 1,0 \text{ mm}^3$ . Taj volumen odgovara kumulativnom održivom području tkiva od  $\geq 200 \text{ mm}^2$  uporabom sekcija debljine  $5 \mu\text{m}$  ili  $\geq 100 \text{ mm}^2$  uporabom sekcija debljine  $10 \mu\text{m}$ . Kumulativno područje tkiva zbroj je područja održivog tkiva u svim sekcijama koji se dostavljaju za ekstrakciju. Na primjer, kumulativno područje tkiva od  $200 \text{ mm}^2$  može se dobiti ekstrakcijom četiri sekcije, svaka debljine od  $5 \mu\text{m}$  s površinom tkiva od  $50 \text{ mm}^2$  ili pet sekcija, svaka debljine od  $10 \mu\text{m}$  s površinom tkiva od po  $20 \text{ mm}^2$ . Nekroza tkiva može smanjiti količinu prinosa nukleinske kiseline. Kako bi se smanjila mogućnost lažno negativnih rezultata, tkivo se može makrodisecirati kako bi se postigao željeni održiv sadržaj tumora.

Visoka količina nekrotičnog tkiva ( $\geq 25 \%$ ) može ometati sposobnost TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje amplifikacije gena i fuzija RNK-a. Ako sekcije uzorka sadrže više od 25 % nekroze u ukupnom području tkiva, tada se nekrotično tkivo mora makrodisecirati. Ako laboratorij koristi RNK s analizom, tkivo s hemoglobinom treba izbjegavati ili minimizirati prilikom uzimanja odsječaka iz bloka tkiva. Pogledajte [Ometajuće tvari na stranici 94](#).

FFPE tkivo na preparatu može se čuvati do 28 dana na sobnoj temperaturi.

## Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline

- Ekstrahirajte RNK i DNK iz FFPE uzoraka tkiva pomoću komercijalno dostupnih kompleta za ekstrakciju. Razlike u kompletima za ekstrakciju mogu utjecati na učinkovitost. Pogledajte odjeljak [Procjena kompleta za ekstrakciju nukleinske kiseline na stranici 92](#).

- Nemojte povećavati proteinazu K ili ekvivalentni enzim tijekom ekstrakcije iz standardne koncentracije navedene u kompletu za ekstrakciju. Pogledajte [Ometajuće tvari na stranici 94](#).
- Pohranite ekstrahirani dio nukleinske kiseline prema uputama proizvođača kompleta za ekstrakciju.
- Pohranite ekstrahirani DNK do 28 dana na temperaturi od -25 °C do -15 °C.
- Pohranite ekstrahirani RNK do 28 dana na temperaturi od -85 °C do -65 °C.
- Kako biste izbjegli promjene u koncentraciji tijekom vremena, izmjerite DNK i RNK unutar 28 dana od početka pripreme biblioteke. Kvantificirajte RNK i DNK pomoću fluorometrijske kvantifikacijske metode koja koristi boje koje se povezuju nukleinskom kiselinom. Koncentracija nukleinske kiseline treba biti srednja vrijednost najmanje tri mjerenja.
- Za analizu je potrebno 40 ng svakog uzorka RNK-a pripremljenog u vodi bez-RNaze/DNaze (nije priloženo) s konačnim volumenom od 8,5 µl (4,7 ng/µl).
- Za analizu je potrebno 40 ng svakog uzorka gDNK-a s minimalnom koncentracijom ekstrakcije od 3,33 ng/µl. Za cijepanje je potreban konačni volumen od 52 µl (0,77 ng/µl) uz minimalno 40 µl TEB-a (priloženo) korištenog kao razrjeđivač.

## Pohrana biblioteke

Biblioteke čuvajte u PCR pločicama s niskim vezanjem 7 do 30 dana, ovisno o vrsti biblioteke (pogledajte [Tablica 6](#)).

Tablica 6 Vrijeme pohrane biblioteke

Vrsta biblioteke	Pločica	Broj dana	Temperatura skladištenja
cDNK	PCF PCR	≤ 7	od -25 °C do -15 °C
Fragmentirani gDNK	LP PCR	≤ 7	od -25 °C do -15 °C
Prethodno obogaćeno	ALS PCR	≤ 30	od -25 °C do -15 °C
Nakon obogaćivanja	ELU2 PCR	≤ 7	od -25 °C do -15 °C
PCR nakon obogaćivanja	PL PCR	≤ 30	od -25 °C do -15 °C
Normalizirano	NL PCR	≤ 30	od -25 °C do -15 °C

# Upozorenja i mjere opreza

## Sigurnost



### UPOZORENJE

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Ventilacija mora biti prikladna za rukovanje opasnim materijalima u reagensima. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kudu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite na sigurnosno-tehničkom listu (SDS) na adresi [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

1. Sa svim uzorcima postupajte kao da su zarazni.
2. Pridržavajte se laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u označenim prostorima za rad. Koristite rukavice za jednokratnu upotrebu i laboratorijske kute kada rukujete uzorcima i reagensima za analizu. Ruke temeljito operite nakon rukovanja uzorcima i reagensima za analizu.

## Laboratorij

1. Kako biste spriječili kontaminaciju, organizirajte laboratorij s jednosmjernim radnim procesom. Područja za predamplifikaciju i postamplifikaciju moraju imati posebnu opremu i materijale (npr. pipete, vrhove pipeta, vrtložnu miješalicu i centrifugu). Kako biste spriječili prijenos amplifikacijskog proizvoda ili sonde, izbjegavajte vraćanje u predamplifikacijsko područje nakon ulaska u postamplifikacijsko područje.
2. Izvršite korake indeksiranja PCR-a i obogaćivanja u postamplifikacijskom području kako biste spriječili prijenos proizvoda amplifikacije.
3. Postupci pripreme biblioteke zahtijevaju okruženje bez-RNaze/DNaze. Temeljito dekontaminirajte radna područja sredstvom za čišćenje koje inhibira-RNazu/DNazu. Koristite plastiku koja je certificirana kao bez DNaze, RNaze i ljudskog genomskog DNK-a.
4. Za postamplifikacijske postupke temeljito očistite radne površine i opremu prije i nakon svakog postupka svježe izrađenom 0,5-postotnom otopinom natrijeva hipoklorita (NaOCl). Ostavite otopinu u dodiru s površinama na 10 minuta, a zatim je temeljito obrišite 70-postotnim etilnim ili izopropilnim alkoholom.
5. Koristite epruvete za mikrocentrifugu, pločice, vrhove pipeta i spremnike bez nukleaze.
6. Tijekom analize koristite kalibriranu opremu. Obavezno kalibrirajte opremu prema brzinama, temperaturama i volumenima navedenim u ovom protokolu.
7. Koristite precizne pipete kako biste osigurali točnu isporuku reagensa i uzorka. Redovito kalibrirajte u skladu sa specifikacijama proizvođača.
8. Prilikom uporabe višekanalnih pipeta koristite sljedeće smjernice:

- Pipetirajte najmanje  $\geq 2 \mu\text{l}$ .
  - Pobrinite se da vrhovi barijere dobro prijanjaju i da odgovaraju marki i modelu višekanalnih pipeta.
  - Pričvrstite vrhove pokretom zavrtnja kako biste bili sigurni da su svi vrhovi jednako dobro pričvršćeni.
  - Aspirirajte pod kutom od  $90^\circ$ , s jednakim razinama volumena tekućine preko svih vrhova.
  - Pomiješajte sve komponente nakon isporuke pipetiranjem reakcijske mješavine gore-dolje.
  - Nakon doziranja provjerite je li tekućina ispuštena iz svakog vrha.
9. Obavezno koristite opremu navedenu za analizu i da ste postavili programe prema uputama.
10. Navedene temperature termociklera i inkubatora za mikrouzorke ukazuju na temperaturu reakcije, a ne nužno na postavljenu temperaturu opreme.

## Analiza

1. Izbjegavajte križnu kontaminaciju.
  - Prilikom rukovanja uzorcima i reagensima pridržavajte se odgovarajućih laboratorijskih praksi.
  - Upotrijebite nov potrošni materijal i laboratorijsko posuđe i svježih vrhove pipeta između uzoraka i između doziranja reagensa.
  - Koristite vrhove otporne na aerosol kako biste smanjili opasnost od križne kontaminacije uzoraka.
  - Koristite jednosmjerni tijek rada prilikom prelaska iz područja predamplifikacije u područja postamplifikacije.
  - Rukujte i otvarajte samo jednu po jednu početnicu za indeksiranje. Ponovno zatvorite svaku epruvetu za indeksiranje odmah nakon uporabe. Dodatni čepovi nalaze se u kompletu.
  - Često mijenjajte rukavice i ako dođu u kontakt s početnicama ili uzorcima indeksa.
  - Iz radnog područja uklonite neiskorištene epruvete s početnicama indeksa.
  - Nemojte vraćati reagense u epruvete za zalihe nakon uporabe s epruvetom s trakom, koritom ili spremnikom.
  - Pomiješajte uzorke pipetom i centrifugirajte pločicu kada je to naznačeno.
  - Koristite vibracijski uređaj za mikropločicu. Nemojte stavljati pločice u vrtložnu miješalicu.
2. Ne međusobno mijenjati komponente analiza iz različitih serija kompleta reagensa. Serije kompleta reagensa navedene su na naljepnici kutije s kompletom reagensa i listu osnovne serije.
3. Primijenite odgovarajuće laboratorijske prakse kako biste spriječili kontaminaciju reagensa, instrumenata, uzoraka i biblioteka nukleazama i PCR proizvodima. Kontaminacija nukleaza i PCR proizvoda može uzrokovati netočne i nepouzdanе rezultate.
4. Za optimalan učinak analize i pohranu potrebna je odgovarajuća vrsta pločice. Obavezno slijedite upute za prijenos pločice u [Upute za upotrebu na stranici 40](#).
5. Nepridržavanje navedenih postupaka kako je navedeno može rezultirati netočnim rezultatima ili značajnom smanjenjem kvalitete biblioteke.

6. Ako u [Upute za upotrebu na stranici 40](#) nije navedena točka sigurnog prekidanja, odmah prijedite na sljedeći korak.
7. Čuvajte reagense za analizu ili komponente na određenoj temperaturi u određenim područjima pred-amplifikacije i post-amplifikacije.
8. Nemojte pohranjivati reagense u jedinici za pohranu bez zamrzavanja ili u odjeljcima vrata hladnjaka.
9. Nemojte zamrzavati reagense koji sadrže zrnca (LNB1, SPB i SMB).
10. Nemojte koristiti reagense koji su nepravilno pohranjeni.
11. Nemojte odstupati od postupaka miješanja i rukovanja koji su navedeni za svaki reagens. Neodgovarajuće miješanje ili prekomjerno miješanje reagensa u vrtložnoj miješalici može dovesti do neuspješnih rezultata uzorka.
12. FSM, SSM, ERA1-B i TCB1 mogu imati čestice povezane s proizvodom. Slijedite smjernice za rukovanje za svaki reagens. Nakon provođenja FSM i SSM koraka miješanja, preostale bijele čestice povezane s proizvodom neće utjecati na učinkovitost.
13. Pripremite svježe glavne mješavine i bacite preostali volumen nakon uporabe.
14. Za korake pranja uvijek pripremite svježi 80-postotni etanol s RNase/DNase-free water. Etanol može apsorbirati vodu iz zraka, što može utjecati na rezultate. Odložite 80-postotni etanol nakon uporabe u skladu s lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima.
15. Prenesite navedenu količinu eluata. Prijenos manje od navedenog volumena eluata tijekom koraka eluiranja može utjecati na rezultate.
16. Za ultrazvučne uređaje koristite sljedeće smjernice. Obavezno slijedite upute proizvođača.
  - Polako umetnite gDNK u epruvetu ultrazvučnog uređaja kako biste izbjegli stvaranje mjehurića. Prekomjerni mjehurići ili sloj zraka u epruveti za cijepanje mogu dovesti do nepotpune fragmentacije.
  - Polako dozirajte u epruvete ultrazvučnog uređaja i izbjegavajte prskanje.
  - Da biste izbjegli pomicanje tekućine i gubitak uzorka, nemojte umetati vrh pipete na dno epruvete ultrazvučnog uređaja prilikom uklanjanja fragmentiranog DNK-a.
17. Nemojte pipetirati unos uzorka manji od 2 µl.
18. Nemojte koristiti korito za doziranje reagensa za korake za koje je potrebno dodati manje od 10 µl materijala u svaku jažicu za uzorak.
19. Pipetom s finim vrhom prenesite fragmentirani uzorak gDNK-a iz epruveta ultrazvučnog uređaja na pločicu Library Prep (LP).
20. Nemojte kombinirati adaptere SUA1 i UMI zajedno.
21. Koristite SUA1 adaptere s uzorcima RNK-a.
22. Koristite UMI adaptere s uzorcima DNK-a.
23. Dodijelite različite početnice indeksa svakom uzorku biblioteke kako biste jedinstveno identificirali svaku biblioteku kada je objedinjena za sekvenciranje na jednoj protočnoj stanici.
24. Nemojte kombinirati početnice CPxx i UPxx indeksa u istoj biblioteci.

25. Nepodudaranja između uzoraka i početnica za indeksiranje dovode do netočnog izvješćivanja o rezultatima zbog gubitka pozitivne identifikacije uzorka. Unesite ID-ove uzoraka i dodijelite indekse u Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) prije početka pripreme biblioteke. Zabilježite ID-ove uzoraka, indeksiranje i orijentaciju jažice pločice za referencu tijekom pripreme biblioteke.
26. Za biblioteke dobivene iz uzoraka RNK-a koristite samo UPxx indekse.
27. Za biblioteke dobivene iz uzoraka DNK-a, koristite UPxx indekse ili CPxx indekse.
28. Sekvencirajte najviše 8 RNK biblioteka i 8 DNK biblioteka po protočnom članku. Sekvencirajte najmanje tri biblioteke. Slijedite smjernice za [Broj biblioteka i odabir indeksa na stranici 37](#).
29. Nakon koraka vezanja u odjeljku [Hvatanje ciljeva jedan na stranici 61](#) i [Hvatanje ciljeva dva na stranici 65](#), odmah prijedite na korak pranja kako biste spriječili sušenje kuglica zrnaca.
30. Tijekom koraka pranja uklonite sav 80-postotni etanol s dna jažica. Preostali etanol može utjecati na rezultate.
31. Za optimalan učinak analize slijedite navedeni broj ispiranja naveden u [Upute za upotrebu na stranici 40](#).
32. Tijekom postupka [Normaliziranje biblioteka na stranici 71](#) temeljito resuspendirajte talog library beads biblioteke kako bi se postigla dosljedna gustoća klastera na protočnoj stanici.
33. Sve ozbiljne incidente povezane s ovim proizvodom odmah prijavite tvrtki Illumina i nadležnim tijelima država članica u kojima borave korisnik i bolesnik.



## Napomene povezane s postupkom

- Tijek rada TSO Comprehensive (EU) može se provesti prema sljedećem rasporedu:
    - 1. dan: Sinteza cDNK-a iz uzoraka RNK-a, DNK fragmentacija uzoraka gDNK-a, priprema biblioteke i početak (prve) hibridizacije preko noći.
    - 2. dan: Obogaćivanje, normalizacija obogaćenih biblioteka i umetanje biblioteka u Instrument NextSeq 550Dx.
- Ako nije moguće provesti tijek rada TSO Comprehensive (EU) u skladu s ovim rasporedom, navodi se nekoliko točaka sigurnog prekidanja u protokolu. Ako u protokolu nije navedena točka sigurnog prekidanja, odmah prijedite na sljedeći korak.
- Biblioteke dobivene iz uzoraka RNK-a i DNK-a mogu se istodobno pripremiti u odvojenim jažicama.
  - Tablice pripreme glavne mješavine uključuju višak volumena kako bi se osiguralo da ima dovoljno volumena za broj uzoraka koji se obrađuju.
  - Koristite molekularnu vodu bez nukleaza.
  - Nakon dodavanja reagensa, isperite vrh aspiriranjem i jednokratnim ispuštanjem u odgovarajuću jažicu na pločici, osim ako nije drugačije navedeno u postupku.
  - Sobna je temperatura definirana kao temperatura od 15 °C do 30 °C.
  - Reagense, uzorke i/ili biblioteke treba čuvati na hladnom u određenim koracima u Uputama za uporabu. To se definira kao držanje na ledu ili ekvivalentu.

### Programi termociklera

- Programirajte programe termociklera na predamplifikacijskoj i postamplifikacijskoj opremi prije početka protokola.
- Provjerite jesu li PCR pločice čvrsto smještene u termocikleru.
- Koristite pločice koje preporučuje proizvođač termociklera.

### Brtvljenje i odbrtvljivanje pločice

- Uvijek zabrtvite pločice novom ljepljivom brtvom pločice. Nemojte ponovno upotrebljavati brtve.
- Da biste zabrtvili pločicu, čvrsto pričvrstite ljepljivi poklopac na pločicu brtvenim klinom ili valjkom.
- Uvijek zabrtvite pločicu s 96 jažica novom ljepljivom brtvom pločice prije sljedećih koraka u protokolu.
  - Koraci trešnje pločice
  - Koraci centrifugiranja
  - koraci temeljnog cikliranja.
  - Hibridizacije

- Dugotrajna pohrana
- Provjerite jesu li rubovi i jažice zabrtvljeni kako biste smanjili rizik od križne kontaminacije i isparavanja.
- Stavite pločicu na ravnu površinu prije nego što polako uklonite brtvu.
- Prije otvaranja, ako primijetite bilo kakvu tekućinu ili kondenzaciju na brtvenim ili bočnim stijenkama jažica pločice, centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute.
- Koristite ljepljive brtve za pločice koje su učinkovite na -20 °C do 100 °C, prikladne za PCR pločice punog profila ili s poluzaštitom.

### Oprema

- Prije početka analize, provjerite je li laboratorijsko osoblje upoznato s uputama proizvođača za upotrebu i održavanje sve opreme.

### Vrsta pločice i prijenosi pločice

- Za optimalan učinak analize i pohranu potrebna je odgovarajuća vrsta pločice.
- Prilikom prijenosa volumena između pločica, prenesite navedeni volumen iz svake jažice pločice u odgovarajuću jažicu na odredišnoj pločici.
- Višekanalne pipete mogu se koristiti prilikom prijenosa uzoraka između traka za epruvete ili pločica.
- Prilikom trešnje pločica koristite sljedeće smjernice.
  - Koristite vibracijski uređaj za pločice kako biste protresli pločice. Nemojte stavljati pločice u vrtložnu miješalicu.
  - Tresite PCR pločice pri 1200 o/min.
  - Tresite MIDI pločice pri 1800 o/min.
  - Slijedite upute proizvođača kako biste bili sigurni da vibracijski uređaj za pločicu čvrsto drži pločicu.

### Centrifugiranje

- Kada upute u protokolu navode kratko centrifugiranje, centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute.
- Ako primijetite tekućinu na brtvi ili na bočnim stranama jažice, centrifugirajte pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute.

### Rukovanje reagensima

- Čvrsto ponovno zatvorite sve epruvete s reagensom odmah nakon uporabe kako biste ograničili isparavanje i spriječili kontaminaciju.
- Vratite reagense na navedenu temperaturu pohrane kada više nisu potrebni za postupak.
- Slijedite pripremu reagensa koja prethodi svakom odjeljku postupka u [Upute za upotrebu na stranici 40](#).

- Obavezno pripremite potreban volumen glavne mješavine, mješavine za eluiranje i 80-postotnog etanola za broj uzoraka koje obrađujete.
- Volumeni navedeni u tablicama glavne mješavine i otopine sadrže prekomjernu količinu. Izračuni prekomjernog volumena su sljedeći.
  - **Tablica 15**
    - Volumen FSM =  $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{broj uzoraka} + \text{kontrola}) \times (1,25)$ .
    - Volumen RVT =  $(0,8 \mu\text{l}) \times (\text{broj uzoraka} + \text{kontrola}) \times (1,25)$ .
  - **Tablica 22**
    - Volumen ERA1-B =  $(7,2 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,20)$ .
    - Volumen ERA1-A =  $(2,8 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,20)$ .
  - **Tablica 30**
    - Volumen EE2 =  $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,364)$ .
    - Volumen HP3 =  $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,364)$ .
  - **Tablica 31**
    - Volumen EE2 =  $(20,9 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,364)$ .
    - Volumen HP3 =  $(1,1 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,364)$ .
  - **Tablica 37**
    - Volumen LNA1 =  $(38,1 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (2,0)$ .
    - Volumen LNB1 =  $(6,9 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (2,0)$ .
  - **Tablica 38**
    - Volumen EE2 =  $(30,4 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,25)$ .
    - Volumen HP3 =  $(1,6 \mu\text{l}) \times (\text{broj biblioteka}) \times (1,25)$ .

## Kompleti adaptera

- TSO Comprehensive (EU) analiza uključuje SUA1 i UMI adaptere.
- SUA1 adapteri namijenjeni su uporabi s uzorcima RNK-a. Nisu za uporabu s uzorcima DNK-a.
- UMI adapteri namijenjeni su za uporabu s uzorcima DNK-a. Nisu za uporabu s uzorcima RNK-a.

## Rukovanje zrnima

- U TSO Comprehensive (EU) analizu uključene su tri vrste zrnaca (SPB, SMB i LNB1). Provjerite koristi li se tijekom postupka ispravna vrsta zrnaca.
- Izvršite točan broj ispiranja za svaku vrstu zrnaca.
- Prije uporabe provjerite jesu li zrnca na sobnoj temperaturi.

- Miješajte zrnca 1 minutu prije uporabe kako biste osigurali homogenost.
- Prilikom miješanja zrnaca pipetom koristite sljedeće smjernice:
  - Upotrijebite odgovarajuću pipetu i veličinu vrha za volumen koji miješate.
  - Podesite postavku volumena na približno 50 – 75 % volumena uzorka.
  - Pipetirajte polako bez otpuštanja klipa.
  - Izbjegavajte prskanje i uvođenje mjehurića.
  - Postavite vrh pipete iznad zrnca i dozirajte izravno u zrnce kako biste otpustili kuglice iz jažice ili epruvete.
  - Provjerite je li kuglica zrnca potpuno u otopini. Otopina bi trebala biti tamno smeđe boje i imati homogenu konzistenciju.
  - Procijenite je li prisutna kuglica zrnca. Pažljivo aspirirajte ukupnu otopinu zrnaca iz jažice u vrh i pogledajte dno jažica.
- Ako se zrnca aspiriraju u vrhove pipeta tijekom koraka magnetnog razdvajanja, vratite mikročestice natrag na jažicu pločice na magnetnom stalku. Pričekajte da se tekućina izbistri (približno 2 minute) prije prelaska na sljedeći korak postupka.
- Prilikom pranja zrnaca:
  - Koristite preporučeni magnetni stalak za pločicu.
  - Nanesite tekućinu izravno na kuglicu zrnca tako da su zrnca na bočnoj strani jažica navlažena.
  - Pločicu držite na magnetnom stalku sve dok upute ne navedu njezino uklanjanje.
  - Nemojte ometati pločicu dok je na magnetnom stalku.
  - Dok je na magnetnom stalku, nemojte remetiti kuglicu zrnca.
- Prilikom pranja zrnaca ili uklanjanja supernatanta, postavite vrhove pipeta pod uglom na dnu jažica kako biste izbjegli stvaranje vakuuma i povlačenje otopine u filtre na vrhu pipete.

## Broj biblioteka i odabir indeksa

Prije postavljanja obrade, isplanirajte broj biblioteka uzoraka i indeksa uzoraka za obradu sekvenciranjem. Sljedeće smjernice za broj uzoraka uključuju pozitivne kontrole, ali isključuju negativne kontrole/kontrole bez predložaka (NTC-ove). NTC-ovi se moraju dodati planiranoj obradi kao dodatni uzorak.

Za TSO Comprehensive (EU) slijedite smjernice iz [Tablica 7](#) i [Tablica 8](#) za određivanje broja RNK i/ili DNK biblioteka za sekvenciranje na jednoj protočnoj stanici. Pogledajte [Tablica 7](#) ako RNK *i/ili* DNK biblioteke sekvencirate odvojeno. Pogledajte [Tablica 8](#) ako RNK *i* DNK biblioteke sekvencirate na istoj protočnoj stanici.

Tablica 7 Sekvenciranje RNK *i/ili* DNK biblioteka

Vrsta biblioteka	Minimalno	Maksimalno*
Samo RNK	3	16
Samo DNK	3	8

\* NTC-ovi ne doprinose pleksitetu.

Tablica 8 Sekvenciranje RNK *i* DNK biblioteka na istoj protočnoj stanici

Vrsta biblioteka	Minimalno	Maksimalno*
RNK	3	8
DNK	3	8

\* NTC-ovi ne doprinose pleksitetu.

Za *optimalnu* uporabu reagensa pri sekvenciranju DNK *i* RNK biblioteka pomoću TSO Comprehensive (EU) na Instrument NextSeq 550Dx, sekvencirajte 8 RNK biblioteka *i* 8 DNK biblioteka po protočnoj stanici.

Početnice za indeksiranje na jedinstven način identificiraju svaki uzorak tako da se biblioteke mogu grupirati zajedno radi sekvenciranja na jednoj protočnoj stanici. Kompatibilne kombinacije indeksa prikazuju se na zaslону Create Run (Stvaranje obrade) tijekom postavljanja obrade na Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Tijekom pripreme biblioteke, dodajte početnicu za indeksiranje u svaku biblioteku uzorka. *Za svaku biblioteku uzorka koristite drugu mješavinu početnica za indeksiranje.*

Provjerite odgovaraju li početnice za indeksiranje koje koristite s uzorcima indeksima koje odaberete za analizu pomoću Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). *Pogreške uzrokuju netočno izvješćivanje o rezultatima zbog gubitka pozitivne identifikacije uzorka.*

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

- **Indeksi UPxx** – Koristite UPxx indekse za biblioteke dobivene iz uzoraka RNK-a ili DNK-a.
- **Indeksi CPxx** – Koristite CPxx indekse za biblioteke dobivene iz uzoraka DNK-a. Nemojte koristiti CPxx indekse za biblioteke dobivene iz RNK-a ili ako ukupno sekvencirate tri biblioteke DNK-a.

Pri sekvenciranju samo tri biblioteke zahtjevi su sljedeći:

- Biblioteke moraju biti sve DNK ili sve RNK.

- Nemojte koristiti skupove CPxx indeksa.
- Za pružanje dovoljne raznolikosti potreban je jedan od sljedećih UPxx indeksa:
  - UP01, UP02 i UP03
  - UP04, UP05 i UP06
  - UP07, UP08 i UP09
  - UP10, UP11 i UP12

Na primjer, prvog je biblioteci dodijeljen UP01, drugoj UP02, a trećoj UP03.

## TruSight Oncology kontrole

TSO Comprehensive (EU) zahtijeva 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 svaku obradu sekvenciranja DNK-a i TruSight Oncology RNK kontrolu za svaku obradu sekvenciranja RNK-a unutar određenog događaja pripreme biblioteke (uključujući kontrole za kombinirane obrade DNK-a i RNK-a). Za svaku planiranu obradu sekvenciranjem priprema se jedinstvena pozitivna kontrola.

Uključite odgovarajući NTC u svaki događaj pripreme RNK i DNK biblioteke. NTC se sekvencira više puta unutar jednog događaja pripreme biblioteke. Slijedite ove smjernice za TruSight Oncology kontrole:

- Pripremite biblioteke od pozitivnih kontrola i kontrola bez predložaka identično uzorcima.
- Koristite TEB za DNK NTC.
- Za RNK NTC koristite DNase/RNase-free water.
- Pozitivne kontrole uključene su u maksimalni zahtjev biblioteke.
- NTC-ovi nisu uključeni u minimalni zahtjev biblioteke.
- Prilikom sekvenciranja 3 biblioteke koristite UP indekse za NTC.
- Budući da se NTC sekvencira više puta, indeksi odabrani za ovu kontrolu ne mogu se ponoviti u događaju pripreme biblioteke.

Sljedeće tablice prikazuju primjer rasporeda pločica za pripremu biblioteke. Svaki numerirani stupac predstavlja jednu obradu sekvenciranjem. Prilikom sekvenciranja biblioteka DNK-a i RNK-a zajedno, svaki odgovarajući skup stupaca predstavlja jednu obradu sekvenciranjem (na primjer, stupac 1 i stupac 7). NTC se sekvencira za svaki stupac ili skup stupaca.

Tablica 9 Događaj pripreme biblioteke pojedinačne obrade koji uključuje šest uzoraka bolesnika

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

Tablica 10 Događaj pripreme biblioteke od tri obrade, uključujući 20 uzoraka bolesnika

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

# Upute za upotrebu

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

## Tijek rada za pripremu biblioteke

[Slika 1](#) prikazuje tijek rada pripreme biblioteke za TSO Comprehensive (EU). Biblioteke iz uzoraka RNK-a i DNK-a mogu se istodobno pripremiti u odvojenim jažicama. Pozitivne kontrole i kontrole bez predloška obrađuju se na isti način kao i uzorci. Točke sigurnog prekidanja označene su između koraka.

Prije pokretanja protokola unesite informacije o obradi i uzorku u Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU). Pogledajte *Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (broj dokumenta 200008661).



Slika 1 TSO Comprehensive (EU) Tijek rada (1. dio)

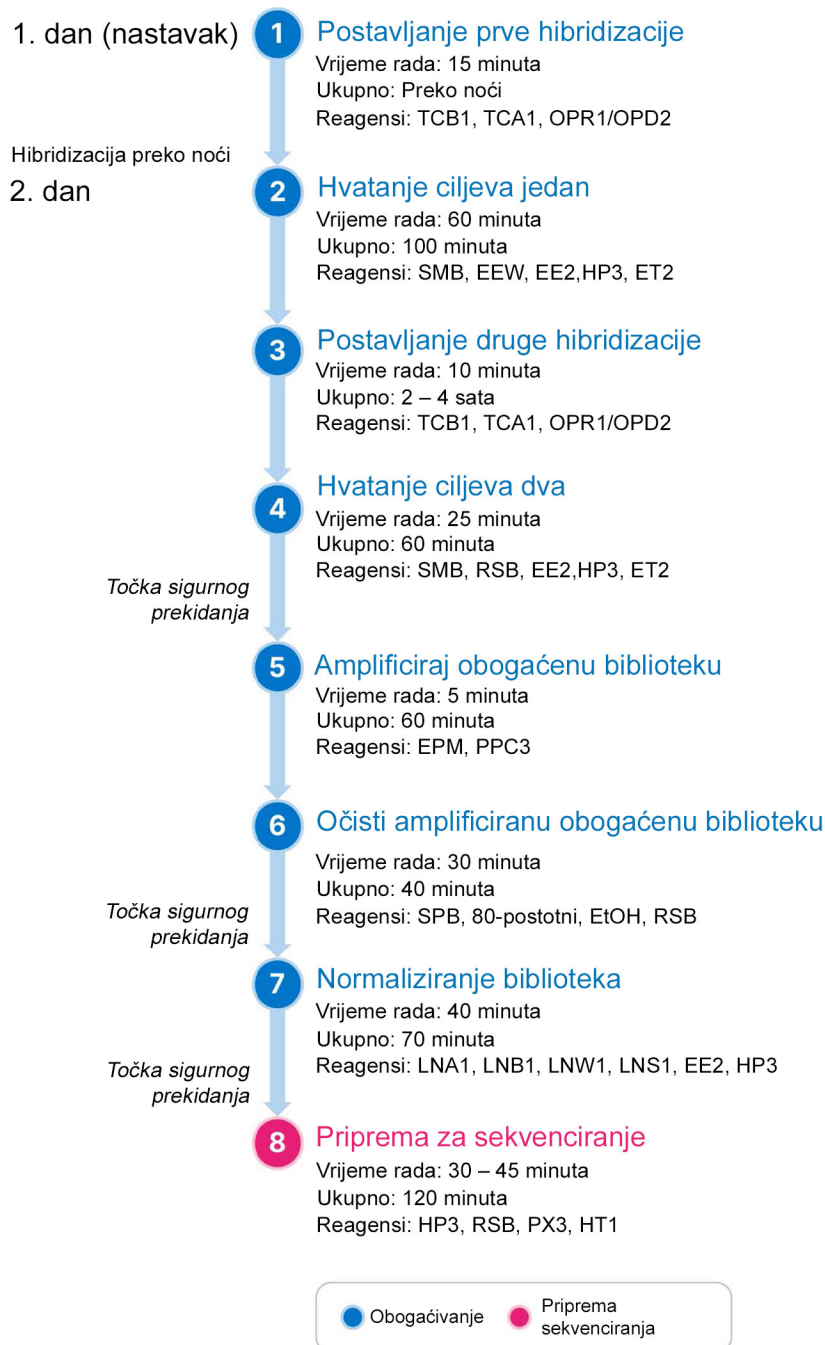


\* Vrijeme rada i ukupno vrijeme je približno.

## Tijek rada obogaćivanja

Slika 2 prikazuje tijek rada obogaćivanja za TSO Comprehensive (EU). Točke sigurnog prekidanja označene su između koraka.

Slika 2 TSO Comprehensive (EU) Tijek rada (2. dio)



## Programiranje termociklera

Prije pokretanja analize, spremite sljedeće programe na predamplifikacijske i postamplifikacijske termociklere.

Tablica 11 Predamplifikacijski programi termociklera

Korak postupka	Naziv programa	Temperatura poklopca	Volumen reakcije	Parametri termociklera
Denaturirajte i zagrijte RNK	LQ-RNA	100 °C	17 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 65 °C u trajanju od 5 minuta</li> <li>• 4 °C u trajanju od 1 minute</li> <li>• Držite na 4 °C</li> </ul>
Sintetizirajte prvi lanac cDNK-a	1stSS	100 °C	25 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 25 °C u trajanju od 10 minuta</li> <li>• 42 °C u trajanju od 15 minuta</li> <li>• 70 °C u trajanju od 15 minuta</li> <li>• 4 °C u trajanju od 1 minute</li> <li>• Držite na 4 °C</li> </ul>
Sintetizirajte drugi lanac cDNK-a	2ndSS	30 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 16 °C u trajanju od 25 minuta</li> <li>• 4 °C u trajanju od 1 minute</li> <li>• Držite na 4 °C</li> </ul>

**NAPOMENA** Ako se temperatura poklopca za 2ndSS ne može postaviti na 30 °C, isključite opciju prethodnog zagrijavanja poklopca.

Tablica 12 Postamplifikacijski programi termociklera

Korak postupka	Naziv programa	Temperatura poklopca	Volumen reakcije	Parametri termociklera
Indeksiranje PCR-a	I-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C u trajanju od 30 sekundi</li> <li>• 15 ciklusa od: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C u trajanju od 10 sekundi</li> <li>• 60 °C tijekom 30 sekundi</li> <li>• 72 °C u trajanju od 30 sekundi</li> </ul> </li> <li>• 72 °C u trajanju od 5 minuta</li> <li>• Držite na 10 °C</li> </ul>

Korak postupka	Naziv programa	Temperatura poklopca	Volumen reakcije	Parametri termociklera
Izvršite prvu hibridizaciju	HYB1	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C tijekom 10 minuta</li> <li>• 85 °C tijekom 2 min. i 30 sekundi</li> <li>• 75 °C tijekom 2 min. i 30 sekundi</li> <li>• 65 °C tijekom 2 min. i 30 sekundi</li> <li>• Držite na 57 °C tijekom 8 do 24 sata</li> </ul>
Izvršite drugu hibridizaciju	HYB2	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95 °C tijekom 10 minuta</li> <li>• 85 °C tijekom 2 min. i 30 sekundi</li> <li>• 75 °C tijekom 2 min. i 30 sekundi</li> <li>• 65 °C tijekom 2 min. i 30 sekundi</li> <li>• Držite na 57 °C tijekom 1,5 do 4 sata</li> </ul>
Amplificiraj obogaćenu biblioteku	EL-PCR	100 °C	50 µl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C u trajanju od 30 s</li> <li>• 18 ciklusa od: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 98 °C u trajanju od 10 s</li> <li>• 60 °C u trajanju od 30 s</li> <li>• 72 °C u trajanju od 30 s</li> </ul> </li> <li>• 72 °C u trajanju od 5 minuta</li> <li>• Držite na 10 °C</li> </ul>

## Priprema za korake protokola

1. Temeljito dekontaminirajte radna područja sredstvom za čišćenje koje inhibira RNazu/DNazu.



**OPREZ**

Svi postupci u tijeku rada zahtijevaju okruženje bez RNaze/DNaze.

2. Provjerite jesu li programi termociklera postavljeni na predamplifikaciju. Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).
3. Slijedite upute proizvođača za postavljanje ultrazvučnog uređaja.
4. Ako obrađujete samo uzorke DNK-a, idite izravno na [Fragmentiranje gDNK-a na stranici 50](#).
5. Izvadite RNK kontrole iz pohrane.
6. Izvadite epruvete s reagensom iz kutije i slijedite upute za odmrzavanje.

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

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
EPH3	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu	Denaturirajte i zagrijte RNK
FSM	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu	Sintetizirajte prvi lanac cDNK-a
RVT	od -25 °C do -15 °C	Držite na hladnom	Sintetizirajte prvi lanac cDNK-a
SSM	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu	Sintetizirajte drugi lanac cDNK-a

Tablica 14 TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno) (PN 20031119)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
SPB (svjetlo zelena naljepnica)	2 °C do 8 °C	Ostavite na sobnoj temperaturi 30 minuta.	Čišćenje cDNK-a
RSB	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Čišćenje cDNK-a

## Denaturirajte i zagrijte RNK

Ovaj postupak denaturira pročišćeni RNK i vrši pripremu slučajnim heksametrima u pripremi za sintezu cDNK-a.

### Priprema

- Pripremite sljedeće reagense.
  - EPH3 – Odložite sa strane.
  - FSM – Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Nakratko centrifugirajte, a zatim pipetirajte da biste pomiješali. Reagens može sadržavati bijele čestice povezane s proizvodom. Nije potrebna nikakva radnja korisnika. Nema utjecaja na učinkovitost proizvoda.
  - RVT – Nakratko centrifugirajte, a zatim pipetirajte da biste pomiješali. Držite na hladnom.

**NAPOMENA** RVT je viskozna otopina. Minimizirajte stvaranje mjehurića tijekom pipetiranja.

- U epruveti za mikrocentrifugu kombinirajte sljedeće volumene za pripremu glavne mješavine FSM + RVT.

Tablica 15 Glavna mješavina FSM + RVT

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

Ova tablica uključuje prekomjerni volumen. Izračune potražite u odjeljku [Rukovanje reagensima na stranici 34](#).

3. Pipetirajte 10 puta kako biste promiješali.
4. Držite glavnu mješavinu FSM + RVT na hladnom do [Sintetizirajte prvi lanac cDNK-a na stranici 46](#).

## Postupak

1. Držite izvađene uzorke RNK-a i RNK kontrole na hladnom tijekom odmrzavanja. Obradite RNK kontrole kao uzorke za ostatak protokola.
2. Držite RNK na hladnom kada se ne koristi. Pogledajte odjeljak [Zahtjevi za uzorke na stranici 27](#) kako biste kvantificirali uzorke.
3. Pipetirajte svaki uzorak RNK 10 puta da se promiješa.
4. Koristite RNase/DNase-free water za pripremu 40 ng svakog uzorka RNK-a u konačnom volumenu od 8,5 µl (4,7 ng/µl).  
Za RNK kontrole koristite koncentraciju navedenu na naljepnici epruvete.
5. Označite novu pločicu za PCR s 96 jažica CF (cDNK fragmenti).
6. Dodajte 8,5 µl svakog uzorka RNK-a u jedinstvenu jažicu CF PCR pločice.
7. Provjerite odgovaraju li raspored pločica za uzorke i indeksi za svaki uzorak obradi koja je planirana u Modul za analizu TSO Comprehensive (EU) tijekom postavljanja obrade.
8. Promiješajte EPH3 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
9. Dodajte 8,5 µl EPH3 u svaku jažicu za uzorak.
10. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na CF PCR pločicu.



### OPREZ

Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.

11. Tresite pri 1200 o/min 1 minutu.
12. Centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute.
13. Stavite u termocikler i pokrenite LQ-RNA program.  
Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).
14. Kada uzorci dostignu 4 °C, držite 1 minutu. Odmah prijedite na sljedeći korak.

## Sintetizirajte prvi lanac cDNK-a

Ovaj postupak reverzno transkribira fragmente RNK-a pripremljene slučajnim heksamerima u prvi lanac cDNK-a pomoću reverse transcriptase.

## Postupak

1. Uklonite CF PCR pločicu s termociklera.

- Pipetirajte 10 puta kako biste promiješali glavnu mješavinu FSM + RVT. Provjerite je li mješavina FSM + RVT potpuno homogena.
- Dodajte 8 µl glavne mješavine FSM + RVT u svaku jažicu za uzorak.
- Pipetirajte 10 puta kako biste promiješali.
- Bacite preostalu glavnu mješavinu FSM + RVT.
- Nanesite ljepljivu brtvu pločice na CF PCR pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
- Tresite pri 1200 o/min 1 minutu.
- Centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute.
- Stavite na termocikler i pokrenite 1stSS program.  
Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).
- Kada uzorci dostignu 4 °C, odmah prijedite na sljedeći korak.  
Uzorci prvog lanca mogu se čuvati na 4 °C do 5 minuta.

## Sintetizirajte drugi lanac cDNK-a

Ovaj postupak uklanja RNK predložak i sintetizira dvolančani cDNK.

### Priprema

- Pripremite sljedeće reagense.
  - SSM – Preokrenite 10 puta kako biste promiješali. Kratko centrifugirajte.

### Postupak

- Uklonite CF PCR pločicu s termociklera.
- Dodajte 25 µl SSM-a u svaku jažicu za uzorak.
- Nanesite ljepljivu brtvu pločice na CF PCR pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
- Tresite pri 1200 o/min 1 minutu.
- Centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute.
- Stavite na termocikler i pokrenite 2ndSS program.  
Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).
- Kada uzorci dostignu 4 °C, pričekajte jednu minutu, a zatim odmah prijedite na sljedeći korak.

## Čišćenje cDNK-a

Ovaj postupak koristi SPB za pročišćavanje cDNK-a od neželjenih reakcijskih komponenti. Zrnca se peru dva puta svježim 80-postotnim EtOH-om. cDNK se eluira s RSB-om.

## Priprema

1. Pripremite sljedeće reagense.
  - SPB – pobrinite se da su zrnca na sobnoj temperaturi 30 minuta.
  - RSB – stavite sa strane za uporabu u postupku.
2. Pripremite svježi 80-postotni EtOH u konusnoj epruveti od 15 ml ili 50 ml kako slijedi.

Tablica 16 Pripremite svježi 80-postotni EtOH

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

3. Promiješajte svježi 80-postotni EtOH u vrtložnoj miješalici.
4. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s BIND1 (vezanje cDNK-a).
5. Pokrijte i odložite sa strane.
6. Postavite magnet.

## Postupak

### Vežite

1. Uklonite CF PCR pločicu s termociklera.
2. Miješajte SPB u vrtložnoj miješalici 1 minutu kako biste ponovno suspendirali zrnca.
3. Odmah dodajte 90 µl SPB-a u svaku biblioteku BIND1 MIDI pločice.  
Ako koristite korito za doziranje SPB-a, pri alikvotiranju dovoljnog materijala po uzorku uključite i faktor prekomjerne količine 1,05. Bacite preostali materijal nakon što je SPB dodan u svaku jažicu za uzorak.
4. Prenesite čitav volumen (50 µl) svakog uzorka iz pločice CF PCR u odgovarajuću jažicu BIND1 MIDI pločice.
5. Bacite praznu CF PCR pločicu.
6. Nanesite brtvu ljepljive pločice na BIND1 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
7. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
8. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
9. Stavite BIND1 MIDI pločicu na magnetni stalak na 5 minuta.
10. Držite pločicu na magnetskom stalku. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl, uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice za uzorak.



## Pranje

1. Operite zrnca na sljedeći način.
  - a. Pločicu BIND1 MIDI držite na magnetnom stalku i dodajte 200 µl svježeg 80-postotnog EtOH-a u svaku jažicu.
  - b. Pričekajte 30 sekundi.
  - c. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice za uzorak.
2. Operite zrnca *drugi* put.
3. Pomoću pipete s finim vrhovima uklonite preostali EtOH iz svake jažice.
4. Bacite neiskorišteni 80-postotni EtOH.

## Eluiranje

1. Uklonite BIND1 MIDI pločicu s magnetnog stalka.
2. Preokrenite ili promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste promiješali RSB.
3. Dodajte 22 µl RSB-a u svaku jažicu za uzorak.
4. Nanesite brtvu ljepljive pločice na BIND1 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
5. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
6. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 2 minute.
7. Stavite na magnetni stalak 2 minute.
8. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s PCF (pročišćeni cDNK fragmenti).  
Ako prekidate na [TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA na stranici 49](#), upotrijebite PCR pločicu.
9. Prenesite 20 µl eluata iz svake jažice uzorka BIND1 MIDI pločice u odgovarajuću jažicu PCF pločice.
10. Bacite praznu BIND1 MIDI pločicu.
11. Dodajte 30 µl RSB-a svakoj posudi za uzorak na PCF pločici.
12. Pipetirajte 10 puta kako biste promiješali.
13. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na pločicu PCF i držite je na hladnom.
14. Vratite EPH3, FSM, RVT i SSM u pohranu.
15. Ako obrađujete uzorke dobivene samo iz RNK-a (cDNK), a ne prekidate na točki sigurnog prekidanja, nastavite s [Obavite popravak kraja i A-Tailing na stranici 53](#).

## TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, centrifugirajte PCF PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute i pohranite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 7 dana.

## Priprema za korake protokola

1. Izvadite DNK kontrole iz pohrane.
2. Izvadite epruvetu s reagensom iz kutije i slijedite upute za odmrzavanje.

Tablica 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno) (PN 20031119)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
TEB	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Fragmentiranje gDNK-a

## Fragmentiranje gDNK-a

Ovaj proces fragmentira gDNK i generira fragmente dsDNK-a s prevjesima od 3' ili 5'.

### Priprema

1. Slijedite preporuke u odjeljku [Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27](#) kako biste kvantificirali uzorke.
2. Pripremite sljedeći reagens:
  - TEB – preokrenite ili promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste ga promiješali.

### Postupak

#### Priprema pločice

1. Odaberite jednu od sljedeće tri opcije za pripremu pločice:
  - **Opcija br. 1:** Obradite uzorke gDNK-a istovremeno s uzorcima cDNK-a na PCF MIDI pločici.
    - a. Označite PCF MIDI pločicu s LP (priprema biblioteke).
    - b. Čuvajte na hladnom i odložite na stranu za uporabu u [Prijenos fragmentiranog DNK-a na stranici 51](#).
  - **Opcija br. 2:** Uzorke gDNK-a obradite istovremeno s uzorcima cDNK-a, a pločica PCF PCR je zamrznuta.
    - a. Odmrznite pločicu PCF PCR na sobnu temperaturu.
    - b. Centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute.
    - c. Pipetirajte 10 puta kako biste promiješali.
    - d. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s LP (priprema biblioteke).
    - e. Prenesite čitavih 50 µl svakog uzorka iz PCF PCR pločice u odgovarajuću jažicu LP MIDI pločice.
    - f. Bacite pločicu PCF PCR.
    - g. Nanesite ljepljivu brtvu pločice i držite je na hladnom sve do [Prijenos fragmentiranog DNK-a na stranici 51](#).
  - **Opcija br. 3:** Obradite samo uzorke gDNK-a.
    - a. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s LP (priprema biblioteke).

Ako se zaustavljate na [TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA na stranici 52](#), upotrijebite pločicu PCR.

- b. Stavite na led i odložite na stranu za uporabu u [Prijenos fragmentiranog DNK-a na stranici 51](#).

## Razrijedite gDNK

- Odmrznite uzorke gDNK-a i DNK kontrole na sobnoj temperaturi.
- Pipetirajte svaki gDNK uzorak 10 puta kako biste ga promiješali.
- Nakratko centrifugirajte epruvetu kako biste prikupili kapljice.
- Preokrenite ili promiješajte TEB u vrtložnoj miješalici kako biste ga promiješali.
- Upotrijebite TEB za pripremu svakog uzorka gDNK-a u konačnom volumenu od 52 µl. U sljedećoj tablici potražite količine unosa i minimalne koncentracije na temelju vrste uzorka.
  - Analiza zahtijeva minimalnu koncentraciju ekstrakcije kako bi se omogućilo najmanje 40 µl volumena TEB-a od 52 µl.
  - Za DNK kontrole koristite koncentraciju navedenu na naljepnici epruvete.
  - Da biste spriječili gubitak uzorka, u ovu otopinu nemojte pipetirati manje od 2 µl uzorka.

Vrsta uzorka	Ulazni količina (ng)	Minimalna koncentracija (ng/µl)
FFPE	40	3,33
Kontrola	40	Pogledajte naljepnicu na epruveti

## Fragment

- Dodajte 52 µl svakog uzorka gDNK-a u zasebnu jažicu epruvete ultrazvučnog uređaja.



### OPREZ

Polako umetnite gDNK u epruvetu, pazeći da na dnu epruvete nema zračnih džepova. Za više informacija, pogledajte odjeljak [Analiza na stranici 30](#) i upute proizvođača.

- Zabilježite orijentaciju trake.
- Fragmentirajte gDNK u fragmente pomoću ultrazvučnog uređaja.

## Prijenos fragmentiranog DNK-a

- Provjerite odgovaraju li raspored pločice za uzorke i indeksi za svaki uzorak obradi koju odaberete za analizu pomoću Modul za analizu TSO Comprehensive (EU).
- Da biste oporavili uzorak, slijedite upute proizvođača ultrazvučnog uređaja. Za neke vrste epruveta ultrazvučnog uređaja potrebno je centrifugiranje radi konsolidacije uzorka u epruveti.
- Za svaki fragmentirani uzorak gDNK-a upotrijebite pipetu s finim vrhovima za izvođenje tri prijenosa od 16,7 µl u praznu jažicu na LP MIDI pločici.

- Nanesite ljepljivu brtvu pločice na LP MIDI pločicu.

### TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, stavite ljepljivu brtvu pločice na LP PCR pločicu i centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute. Pohranite na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 7 dana.

## Priprema za korake protokola

Provjerite jesu li programi termociklera postavljeni na postamplifikaciju. Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).

- Pripremite posudu s ledom ili ekvivalentnu posudu.
- Izvadite epruvetu s reagensom iz kutije i slijedite upute za odmrzavanje.

Tablica 18 TruSight Oncology Comp Library Prep (zamrznuto) kutija (PN 20031118)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
ERA1-A	od -25 °C do -15 °C	Držite na hladnom.	Obavite popravak kraja i A-Tailing
ERA1-B	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Obavite popravak kraja i A-Tailing
ALB1	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Adapteri za povezivanje
LIG3	od -25 °C do -15 °C	Držite na hladnom.	Adapteri za povezivanje
SUA1 (plavi čep)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Adapteri za povezivanje
UMI (bijeli čep)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Adapteri za povezivanje
STL	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Adapteri za povezivanje
EPM	od -25 °C do -15 °C	Držite na hladnom.	Indeksiranje PCR-a

Tablica 19 TruSight Oncology Comp Library Prep (rashlađeno) kutija (PN 20031119)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
SPB (svjetlo zelena naljepnica)	2 °C do 8 °C	Ostavite na sobnoj temperaturi 30 minuta.	Čišćenje ligacije
RSB	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Čišćenje ligacije

Tablica 20 TruSight Oncology Comp UP Index Primers kutija (PN 20031120)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
UPxx	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite odgovarajuće epruvete s početnicama za indeksiranje na sobnu temperaturu.	Indeksiranje PCR-a

Tablica 21 TruSight Oncology Comp CP Index Primers kutija (PN 20031126)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
CPxx	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite odgovarajuće epruvete s početnicama za indeksiranje na sobnu temperaturu.	Indeksiranje PCR-a

## Obavite popravak kraja i A-Tailing

Ovim se postupkom popravljaju prevjesi koji su rezultat fragmentacije na krajevima s prevjesom na A-repu pomoću glavne mješavine End Repair A-Tailing (ERA1).

Aktivnost egzonukleaze ove mješavine od 3' do 5' uklanja prevjese od 3', a aktivnost polimeraze od 5' do 3' ispunjava prevjese od 5'. Krajevi 3' imaju A-rep tijekom ove reakcije kako bi se spriječilo da se međusobno ligiraju tijekom reakcije ligiranja adaptera.

### Priprema

- Zagrijte 2 inkubatora za mikrouzorke pomoću MIDI umetka toplinskog bloka kako slijedi.
  - Zagrijte inkubator za mikrouzorke na 30 °C.
  - Zagrijte inkubator za mikrouzorke na 72 °C.
- Pripremite sljedeće reagense.
  - ERA1-A – Nakratko centrifugirajte, a zatim pipetirajte da biste pomiješali. Držite na hladnom.
  - ERA1-B – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte. Pregledajte ima li taloga. Ako su prisutni, zagrijte epruvetu na 37 °C, a zatim pipetirajte da biste miješali dok se talog ne otopi.
- Pripremite glavnu mješavinu ERA1 u epruveti za mikrocentrifugu.

Tablica 22 ERA1 glavna mješavina<sup>1</sup>

Komponenta glavne mješavine	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

<sup>1</sup> Ova tablica uključuje prekomjerni volumen. Izračune potražite u odjeljku [Rukovanje reagensima na stranici 34](#).

- Pipetirajte polako 10 puta kako biste osigurali homogenost, a zatim kratko centrifugirajte. Održavajte glavnu mješavinu ERA1 hladnom.
- Za pripremu pločice odaberite jednu od sljedećih opcija:

- **Opcija br. 1:** Ako se uzorci nalaze na MIDI ploči, pripremite na sljedeći način.
  - Ponovno označite MIDI pločicu s LP2 (priprema biblioteke 2).
  - Ako su neki uzorci u odvojenim MIDI pločicama, premjestite sve uzorke kako biste razdvojili jažice iste MIDI pločice prema rasporedu pločice.
- **Opcija br. 2:** Ako je pločica zamrznuta, pripremite na sljedeći način.
  - a. Odmrzните pločicu PCF PCR ili pločicu LP PCR na sobnu temperaturu.
  - b. Centrifugirajte pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute.
  - c. Pipetirajte 10 puta kako biste promiješali.
  - d. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s LP2 (priprema biblioteke 2).
  - e. Prenesite čitavih 50 µl svakog uzorka s PCF PCR pločice ili LP PCR pločice u odgovarajući otvor LP2 MIDI pločice.
  - f. Bacite pločicu PCF PCR ili LP PCR.

## Postupak

1. Dodajte 10 µl glavne mješavine ERA1 u svaku jažicu za uzorak na LP2 MIDI pločici.
2. Bacite preostalu glavnu mješavinu ERA1.
3. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na LP2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
4. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
5. Inkubirajte u prethodno zagrijanom inkubatoru za mikrouzorke na 30 °C u trajanju od 30 minuta.
6. Odmah prebacite u drugi, prethodno zagrijani inkubator za mikrouzorke.
7. Inkubirajte 20 minuta na temperaturi od 72 °C.
8. Držite LP2 MIDI pločicu na hladnom 5 minuta.

## Adapteri za povezivanje

Ovim se postupkom adapteri povezuju do krajeva fragmenata cDNK i/ili gDNK.

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

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

## Priprema

1. Pripremite sljedeće reagense.
  - ALB1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici najmanje 10 sekundi, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - LIG3 – Nakratko centrifugirajte, a zatim pipetirajte kako biste pomiješali. Držite na hladnom.

- SUA1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici najmanje 10 sekundi, a zatim nakratko centrifugirajte.
- UMI – Promiješajte u vrtložnoj miješalici najmanje 10 sekundi, a zatim nakratko centrifugirajte.
- STL – Stavite sa strane za uporabu u postupku.

## Postupak

1. Uklonite LP2 MIDI pločicu s leda ili ekvivalenta.
2. Dodajte 60 µl ALB1 u svaku jažicu za uzorak na LP2 MIDI pločici. ALB1 je viskozna otopina. Pipetirajte polako kako biste minimizirali stvaranje mjehurića.
3. Dodajte 5 µl LIG3 u svaku jažicu za uzorak.
4. Dodajte adaptere na sljedeći način.  
*Nemojte kombinirati različite vrste adaptera zajedno.*
  - **Jažice s RNK uzorkom** – 10 µl SUA1 (plavi čep) za svaki uzorak izveden iz RNK-a.
  - **Jažice s DNK uzorkom** – 10 µl UMI (bijeli čep) za svaki uzorak izveden iz DNK-a.
5. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na LP2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
6. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
7. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.
8. Promiješajte STL u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
9. Dodajte 5 µl STL-a u svaku jažicu za uzorak na LP2 MIDI pločici.
10. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na LP2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
11. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.

## Čišćenje ligacije

Ovaj postupak koristi SPB za pročišćavanje fragmenata cDNK-a ili gDNK-a povezanih adapterom i uklanjanje neželjenih proizvoda. Zrnca se peru dva puta svježim 80-postotnim etanolom. Uzorci povezani adapterom eluiraju se s RSB-om.

## Priprema

1. Pripremite sljedeće reagense.
  - SPB – pobrinite se da su zrnca na sobnoj temperaturi 30 minuta.
  - RSB – stavite sa strane za uporabu u postupku.
2. Pripremite svježi 80-postotni EtOH u konusnoj epruveti od 15 ml ili 50 ml.

Tablica 23 Pripremite svježi 80-postotni etanol

Reagens	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
100-postotni EtOH, 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

- Promiješajte svježi 80-postotni EtOH u vrtložnoj miješalici.
- Postavite magnet.

## Postupak

### Vežite

- Miješajte SPB u vrtložnoj miješalici 1 minutu kako biste ponovno suspendirali zrnca.
- Odmah dodajte 112 µl SPB-a u jažicu za uzorak LP2 MIDI pločice.  
Ako koristite korito za doziranje SPB-a, pri alikvotiranju dovoljnog materijala po uzorku uključite i faktor prekomjerne količine 1,05. Bacite preostali materijal nakon što je SPB dodan u svaku jažicu za uzorak.
- Nanesite ljepljivu brtvu pločice na LP2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
- Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
- Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
- Postavite LP2 MIDI pločicu na magnetni stalak na 10 minuta.
- Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice za uzorak.



## Pranje

1. Operite zrnca na sljedeći način.
  - a. Držite LP2 MIDI pločicu na magnetnom stalku i dodajte 200 µl svježeg 80-postotnog EtOH-a u svaku jažicu za uzorak.
  - b. Pričekajte 30 sekundi.
  - c. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice za uzorak.
2. Operite zrnca *drugi* put.
3. Pomoću pipete s finim vrhovima uklonite preostali EtOH iz svake jažice.
4. Bacite neiskorišteni 80-postotni EtOH.

## Eluiranje

1. Uklonite LP2 MIDI pločicu s magnetnog stalka.
2. Preokrenite ili promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste promiješali RSB.
3. Dodajte 27,5 µl RSB-a u svaku jažicu za uzorak.
4. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na LP2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
5. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
6. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 2 minute.
7. Stavite LP1 MIDI pločicu na magnetni stalak na 2 minute.
8. Označite novu PCR pločicu s 96 jažica s LS (uzorci biblioteke).
9. Prenesite 25 µl svakog eluata iz LP2 MIDI pločice u odgovarajuću jažicu LS PCR pločice.
10. Bacite praznu LP2 MIDI pločicu.

## Indeksiranje PCR-a

U ovom koraku, fragmenti biblioteke pojačavaju se pomoću početnica koje dodaju sekvence indeksa za višestruko miješanje uzoraka. Dobiveni proizvod sadrži kompletnu biblioteku cDNK-a i/ili fragmenata DNK-a koje okružuju adapteri potrebni za generiranje klastera.

## Priprema

1. Pripremite sljedeće reagense.
  - EPM – održavajte hladnim.
  - UPxx – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte. UPxx je početnica za indeksiranje odabrana na zaslonu Create Run (Stvaranje obrade) u softveru Local Run Manager tijekom postavljanja obrade.

- CPxx – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte. CPxx je početnica za indeksiranje odabrana na zaslonu Create Run (Stvaranje obrade) u softveru Local Run Manager tijekom postavljanja obrade.
2. Provjerite podudaraju li se indeksi za svaki uzorak s obradom planiranom na Modul za analizu TSO Comprehensive (EU) tijekom postavljanja obrade. Obavezno slijedite upute u vezi s odabirom indeksa u [Broj biblioteka i odabir indeksa na stranici 37](#).

**OPREZ**

Nepodudaranja između uzoraka i početnica za indeksiranje dovode do netočnog izvješćivanja o rezultatima zbog gubitka pozitivne identifikacije uzorka.

**Postupak**

1. Dodajte 5 µl odgovarajuće početnice za indeksiranje (UPxx ili CPxx) u odgovarajuću jažicu za uzorak na LS PCR pločici prema odabranim indeksima.

**OPREZ**

Rukujte i otvarajte samo jednu po jednu epruvetu s početnicom za indeksiranje. Ponovno zatvorite svaku epruvetu za indeksiranje novim čepom odmah nakon uporabe. Nemojte kombinirati početnice za indeksiranje.

2. Promiješajte EPM u vrtložnoj miješalici u trajanju od 5 sekundi, a zatim nakratko centrifugirajte.
3. Dodajte 20 µl EPM-a u svaku jažicu za uzorak.
4. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na LS PCR pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
5. Tresite pri 1200 o/min 1 minutu.
6. Vratite reagense za predamplifikaciju u pohranu.

**OPREZ**

Provedite sve daljnje korake u postamplifikacijskom području kako biste spriječili prijenos amplifikacijskih proizvoda.

7. Centrifugirajte LS PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute.
8. Stavite na unaprijed programirani termocikler za postamplifikaciju i pokrenite program I-PCR.  
Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).  
Ako nastavljate s [Postavljanje prve hibridizacije na stranici 59](#), slijedite upute za odmrzavanje reagensa u Priprema za korake protokola.
9. Nakon završetka programa I-PCR, centrifugirajte LS PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute.
10. Ponovno označite ALS pločicu (pojačani uzorci biblioteke).

**TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA**

U slučaju prekidanja, pohranite ALS PCR pločicu na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.

**Priprema za korake protokola**

1. Provjerite jesu li programi termociklera postavljeni na postamplifikaciju. Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).
2. Izvadite epruvetu s reagensom iz kutije i slijedite upute za odmrzavanje.

Tablica 24 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (PN 20031123)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
TCB1	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Postavljanje prve hibridizacije

Tablica 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto) kutija (PN 20031121)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
TCA1	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Postavljanje prve hibridizacije

Tablica 26 TruSight Oncology Comp Content Set kutija (PN 20031122)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
OPR1 (crveni čep)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Postavljanje prve hibridizacije
OPD2 (bijeli čep)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Postavljanje prve hibridizacije

**Postavljanje prve hibridizacije**

Tijekom ovog postupka skup oligosa hibridizira se u cDNK biblioteke, a skup oligosa hibridizira se u gDNK biblioteke pripremljene u [Indeksiranje PCR-a na stranici 57](#). Obogaćivanje ciljnih regija zahtijeva dva koraka hibridizacije. U prvoj hibridizaciji, oligos se hibridizira u cDNK i/ili gDNK biblioteke preko noći (8 sati do 24 sata).

**Priprema**

1. Pripremite sljedeće reagense.
  - TCB1 – zagrijavajte epruvetu na 37 °C u trajanju od 5 minuta. Promiješajte u vrtložnoj miješalici u trajanju od 10 sekundi, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - TCA1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - OPR1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - OPD2 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

2. Ako je ALS PCR pločica pohranjena, odmrznite na sobnu temperaturu i centrifugirajte na  $280 \times g$  u trajanju od 1 minute. Pomiješajte pipetiranjem.
3. Označite novu PCR pločicu s 96 jažica s HYB1 (hibridizacija 1).

## Postupak

1. Prenesite 20  $\mu$ l svake cDNK i/ili gDNK biblioteke s ALS PCR pločice u odgovarajuću jažicu na HYB1 PCR pločici.
2. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na ALS PCR pločicu i odložite je sa strane. Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
3. Pregledajte TCB1 ima li taloga. Ako su prisutni, ponovno zagrijte epruvetu i miješajte je u vrtložnoj miješalici dok se kristali ne otope.
4. Dodajte 15  $\mu$ l TCB1 u svaku biblioteku u HYB1 PCR pločici.
5. Dodajte 10  $\mu$ l TCA1 u svaku biblioteku u HYB1 PCR pločici.
6. Dodajte sonde.
 

*Nemojte* kombinirati različite vrste sonde zajedno. Dodajte samo jedan komplet sonde po jažici.

  - Jažice za RNK biblioteku – 5  $\mu$ l OPR1 (crveni čep) za svaku biblioteku izvedenu iz RNK-a.
  - Jažice za TSO Comprehensive (EU) DNK biblioteku – 5  $\mu$ l OPD2 (bijeli čep) u svaku biblioteku izvedenu iz DNK-a.
7. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na HYB1 PCR pločicu. Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
8. Tresite pri 1200 o/min 2 minute.
9. Stavite na termocikler i pokrenite HYB1 program. Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).
10. Hibridizirajte na 57 °C najmanje 8 sati do najviše 24 sata.
11. Vratite reagense za hibridizaciju u pohranu.
12. ALS PCR pločicu čuvajte na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.

## Priprema za korake protokola

1. Na početku 2. dana, izvadite epruvetu s reagensom iz kutije i slijedite upute za otapanje.

Tablica 27 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (PN 20031123)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
SMB (tamno plava naljepnica)	2 °C do 8 °C	Ostavite na sobnoj temperaturi 30 minuta.	Hvatanje ciljeva jedan Hvatanje ciljeva dva

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
ET2	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Hvatanje ciljeva jedan Hvatanje ciljeva dva
HP3	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Hvatanje ciljeva jedan Hvatanje ciljeva dva Normaliziranje biblioteka
TCB1	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Postavljanje druge hibridizacije
RSB	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Hvatanje ciljeva dva Očisti amplificiranu obogaćenu biblioteku

Tablica 28 TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto) kutija (PN 20031121)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
EE2	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Hvatanje ciljeva jedan Hvatanje ciljeva dva Normaliziranje biblioteka
EEW	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Hvatanje ciljeva jedan
TCA1	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Postavljanje druge hibridizacije

Tablica 29 Analiza Kutija kompleta sa sadržajem (PN 20031122)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
OPR1 (crveni čep)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Postavljanje druge hibridizacije
OPD2 (bijeli čep)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Postavljanje druge hibridizacije

## Hvatanje ciljeva jedan

Ovaj korak koristi SMB za hvatanje sondi hibridiziranih na ciljanim regijama od interesa. Zrnca se peru tri puta EEW-om. Obogaćene biblioteke eluiraju se pomoću svježe mješavine za eluiranje EE2 + HP3 i neutraliziraju pomoću ET2.

### Priprema

1. Zagrijte inkubator za mikrouzorke pomoću MIDI umetka toplinskog bloka na 57 °C.

2. Pripremite sljedeće reagense.
  - EEW – Promiješajte u vrtložnoj miješalici 1 minutu.
  - EE2 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - HP3 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - SMB – Pobrinite se da su zrnca na sobnoj temperaturi 30 minuta. Obavezno koristite **SMB**, a ne SPB za ovaj postupak.
  - ET2 – Odložite na stranu za uporabu u postupku.
3. Pripremite svježu mješavinu za eluiranje EE2 + HP3 u epruveti za mikrocentrifugu.

Tablica 30 EE2 + HP3 mješavina za eluiranje za hvatanje ciljeva jedan

Komponenta mješavine za eluiranje	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 tablica uključuje prekomjerni volumen. Izračune potražite u odjeljku [Rukovanje reagensima na stranici 34](#).

4. Promiješajte mješavinu za eluiranje EE2 + HP3 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte. Stavite na stranu za korak [Eluiranje na stranici 63](#).
5. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s CAP1 (hvatanje 1).
6. Postavite magnet.

## Postupak

### Vežite

1. Uklonite HYB1 PCR pločicu s termociklera.
2. Centrifugirajte HYB1 PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute.
3. Promiješajte SMB u vrtložnoj miješalici u trajanju od 1 minute kako biste ponovno suspendirali zrnca.
4. Odmah dodajte 150 µl SMB-a u svaku biblioteku CAP1 MIDI pločice.
 

Ako koristite korito za doziranje SMB-a, uključite faktor prekomjerne količine 1,15 pri alikvotiranju kako biste omogućili dovoljno materijala po uzorku.

Nakon što je SMB dodan u svaku jažicu za uzorak, bacite preostali materijal.
5. Postavite pipetu na 50 µl i prenesite sav volumen iz svake biblioteke HYB1 PCR pločice u odgovarajuću jažicu CAP1 MIDI pločice.
6. Bacite praznu HYB1 PCR pločicu.
7. Nanesite brtvu ljepljive pločice na CAP1 MIDI pločicu.
 

Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
8. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
9. Inkubirajte u prethodno zagrijanom inkubatoru za mikrouzorke na 57 °C u trajanju od 25 minuta.

10. Stavite CAP1 MIDI pločicu na magnetni stalak na 2 minute.
11. Držite pločicu na magnetskom stalku. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.

**OPREZ**

Odmah prijedite na sljedeći korak ([Pranje na stranici 63](#)). Nemojte dopustiti da kuglica zrnca ostane dulje vrijeme bez prisutne tekućine.

**Pranje**

1. Operite zrnca na sljedeći način.
  - a. Uklonite CAP1 MIDI pločicu s magnetnog stalka.
  - b. Dodajte 200 µl EEW-a u svaku jažicu.
  - c. Upotrijebite pipetu s postavljenim volumenom na 150 µl i pipetirajte najmanje 10 puta kako biste promiješali. Provjerite jesu li sva zrnca resuspendirana.  
Provjerite da nema kuglica zrnaca pažljivo aspirirajući ukupnu otopinu zrnaca u vrh. Vizualno pregledajte dno svake jažice. Ako je prisutna kuglica zrnca, nagnite vrh pipete prema kuglici zrnca tijekom koraka pranja kako biste oslobodili kuglicu. Provjerite je li kuglica zrnca potpuno uronjena u otopinu. Otopina bi trebala izgledati tamnosmeđe i imati homogenu konzistenciju.
  - d. Nanesite brtvu ljepljive pločice na CAP1 MIDI pločicu.
  - e. Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
  - f. Tresite pri 1800 o/min u trajanju od 4 minute.
  - g. Inkubirajte u inkubatoru za mikrouzorke na 57 °C u trajanju od 5 minuta.
  - h. Stavite BIND1 MIDI pločicu na magnetni stalak na 2 minute.
  - i. Držite pločicu na magnetskom stalku. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.
2. Operite zrnca *drugi* put.
3. Operite zrnca *treći* put.
4. Pomoću pipete s finim vrhovima uklonite preostali EtOH iz svake jažice.

**Eluiranje**

1. Uklonite CAP1 MIDI pločicu s magnetnog stalka.
2. Promiješajte svježu mješavinu za eluiranje EE2 + HP3 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
3. Dodajte 17 µl EE2 + HP3 mješavine za eluiranje u svaku jažicu biblioteke na CAP1 MIDI pločici.
4. Bacite preostalu EE2 + HP3 mješavinu za eluiranje.
5. Nanesite brtvu ljepljive pločice na CAP1 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.

6. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
7. Stavite na magnetni stalak 2 minute.
8. Označite novu PCR pločicu s 96 jažica s ELU1 (eluiranje 1).
9. Promiješajte ET2 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
10. Dodajte 5 µl ET2 svaku odgovarajuću jažicu biblioteke u novoj ELU1 PCR pločici.
11. Pažljivo prenesite 15 µl eluata iz svake jažice biblioteke CAP1 MIDI pločice u odgovarajuću jažicu ELU1 PCR pločice.
12. Bacite praznu CAP1 MIDI pločicu.
13. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na ELU1 PCR pločicu.
14. Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
15. Tresite pri 1200 o/min 2 minute.
16. Vratite EEW u skladište.

## Postavljanje druge hibridizacije

Ovaj korak veže ciljane regije obogaćenih cDNK i/ili gDNK biblioteka sa sondama za hvatanje po drugi put. Druga hibridizacija osigurava visoku specifičnost uhvaćenih područja. Kako bi se osiguralo optimalno obogaćivanje biblioteka, provedite drugi korak hibridizacije na 57 °C u trajanju od najmanje 1,5 sata do najviše 4 sata.

### Priprema

1. Pripremite sljedeće reagense.
  - TCB1 – zagrijavajte epruvetu na 37 °C u trajanju od 5 minuta. Promiješajte u vrtložnoj miješalici u trajanju od 10 sekundi, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - TCA1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - OPR1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - OPD2 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

### Postupak

1. Pregledajte TCB1 ima li taloga. Ako su prisutni, ponovno zagrijte epruvetu i miješajte u vrtložnoj miješalici je dok se kristali ne otope.
2. Dodajte 15 µl TCB1 u svaku biblioteku u ELU1 PCR pločici.
3. Dodajte 10 µl TCA1 u svaku jažicu biblioteke.
4. Dodajte sonde.

*Nemojte* kombinirati različite vrste sondi zajedno.

  - Jažice za RNK biblioteku – 5 µl OPR1 (crveni čep) za svaku biblioteku izvedenu iz RNK-a.
  - Jažice DNK biblioteke – 5 µl OPD2 (bijeli čep) u svaku biblioteku izvedenu iz DNK-a.



5. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na ELU1 PCR pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
6. Tresite pri 1200 o/min 2 minute.
7. Stavite na termocikler i pokrenite HYB2 program.  
Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).
8. Hibridizirajte na 57 °C najmanje 1,5 sat do najviše 4 sata.
9. Vratite hibridizirane reagense u pohranu.

## Hvatanje ciljeva dva

Ovaj korak koristi SMB za hvatanje sonda hibridiziranih na ciljanim regijama od interesa. Zrnca se peru jednom s RSB-om. Obogaćene biblioteke eluiraju se pomoću svježije mješavine za eluiranje EE2 + HP3 i neutraliziraju pomoću ET2.

### Priprema

1. Zagrijte inkubator za mikrouzorke pomoću MIDI umetka toplinskog bloka na 57 °C.
2. Pripremite sljedeće reagense.
  - EE2 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - HP3 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - SMB – Pobrinite se da su zrnca na sobnoj temperaturi 30 minuta.  
Obavezno koristite **SMB**, a ne SPB za ovaj postupak.
  - RSB – stavite sa strane za uporabu u postupku.
  - ET2 – Odložite na stranu za uporabu u postupku.
3. Pripremite svježiju mješavinu za eluiranje EE2 + HP3 u epruveti za mikrocentrifugu.

Tablica 31 EE2 + HP3 mješavina za eluiranje za hvatanje ciljeva dva

Komponenta mješavine za eluiranje	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 tablica uključuje prekomjerni volumen. Izračune potražite u odjeljku [Rukovanje reagensima na stranici 34](#).

4. Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte. Stavite na stranu za korak [Eluiranje na stranici 67](#).
5. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s CAP2 (hvatanje 2).
6. Postavite magnet.

## Postupak

### Vežite

1. Uklonite ELU1 PCR pločicu s termociklera.
2. Centrifugirajte ELU1 PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute.
3. Promiješajte SMB u vrtložnoj miješalici u trajanju od 1 minute kako biste ponovno suspendirali zrnca.
4. Odmah dodajte 150 µl SMB-a u svaku biblioteku CAP2 MIDI pločice.  
Ako koristite korito za doziranje SMB-a, uključite faktor prekomjerne količine 1,15 pri alikvotiranju kako biste omogućili dovoljno materijala po uzorku.  
Nakon što je SMB dodan u svaku jažicu za uzorak, bacite preostali materijal.
5. Postavite pipetu na 50 µl i prenesite sav volumen iz svake biblioteke ELU1 PCR pločice u odgovarajuću jažicu CAP2 MIDI pločice.
6. Bacite praznu ELU1 PCR pločicu.
7. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na CAP2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
8. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
9. Inkubirajte u inkubatoru za mikrouzorke na 57 °C u trajanju od 25 minuta.  
Ako nastavljate s [Amplificiraj obogaćenu biblioteku na stranici 68](#), slijedite upute za odmrzavanje reagensa u odjeljku Priprema za korake protokola.
10. Stavite na magnetni stalak 2 minute.
11. Držite CAP2 MIDI pločicu na magnetnom stalku. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.



### OPREZ

Odmah prijedite na sljedeći korak ([Pranje na stranici 66](#)). Nemojte dopustiti da kuglica zrnca ostane dulje vrijeme bez prisutne tekućine.

### Pranje

1. Uklonite CAP2 MIDI pločicu s magnetnog stalka.
2. Preokrenite ili promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste promiješali RSB.
3. Dodajte 200 µl RSB-a u svaku jažicu.
4. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na CAP2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
5. Tresite pri 1800 o/min u trajanju od 4 minute.
6. Postavite pločicu na magnetni stalak na 2 minute.

7. Držite pločicu na magnetskom stalku. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.
8. Pomoću pipete s finim vrhovima uklonite preostali EtOH iz svake jažice.

## Eluiranje

1. Uklonite CAP2 MIDI pločicu s magnetnog stalka.
2. Promiješajte svježu mješavinu za eluiranje EE2 + HP3 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
3. Dodajte 22 µl EE2 + HP3 mješavine za eluiranje u svaku jažicu biblioteke na CAP2 MIDI pločici.
4. Bacite preostalu EE2 + HP3 mješavinu za eluiranje.
5. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na CAP2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
6. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
7. Stavite na magnetni stalak 2 minute.
8. Označite novu PCR pločicu s 96 jažica s ELU2 (eluiranje 2).
9. Promiješajte ET2 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
10. Dodajte 5 µl ET2 svaku odgovarajuću jažicu biblioteke u novoj ELU2 PCR pločici.
11. Pažljivo prenesite 20 µl eluata iz svake jažice biblioteke CAP2 MIDI pločice u odgovarajuću jažicu ELU2 PCR pločice.
12. Bacite praznu CAP2 MIDI pločicu.
13. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na PCR ELU2 pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
14. Tresite pri 1200 o/min 2 minute.
15. Vratite SMB, EE2, HP3 i ET2 u pohranu.

## TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, centrifugirajte ELU2 PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute i čuvajte je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 7 dana. Vratite RSB u pohranu.

## Priprema za korake protokola

1. Pripremite posudu s ledom ili ekvivalentnu posudu.
2. Izvadite epruvetu s reagensom iz kutije i slijedite upute za odmrzavanje.

Tablica 32 TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto) kutija (PN 20031121)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
PPC3	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Amplificiraj obogaćenu biblioteku

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
EPM	od -25 °C do -15 °C	Držite na hladnom.	Amplificiraj obogaćenu biblioteku

Tablica 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (PN 20031123)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
SPB (svjetlo zelena naljepnica)	2 °C do 8 °C	Ostavite na sobnoj temperaturi 30 minuta.	Očisti amplificiranu obogaćenu biblioteku
RSB	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Očisti amplificiranu obogaćenu biblioteku Priprema za sekvenciranje

## Amplificiraj obogaćenu biblioteku

Ovaj korak koristi početnice za amplifikaciju obogaćenih biblioteka.

### Priprema

1. Ako je pločica ELU2 pohranjena, odmrznite na sobnu temperaturu, a zatim centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute.

### Postupak

1. Promiješajte PPC3 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
2. Dodajte 5 µl PPC3 u svaku jažicu biblioteke na ELU2 PCR pločici.
3. Promiješajte EPM u vrtložnoj miješalici u trajanju od 5 sekundi, a zatim nakratko centrifugirajte.
4. Dodajte 20 µl EPM-a u svaku jažicu biblioteke.
5. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na PCR ELU2 pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
6. Tresite pri 1200 o/min 2 minute.
7. Stavite na termocikler i pokrenite EL-PCR program.  
Pogledajte odjeljak [Programiranje termociklera na stranici 43](#).  
Ako nastavljate s [Normaliziranje biblioteka na stranici 71](#), slijedite upute za odmrzavanje u odjeljku plana ispitivanja Priprema za korake protokola.
8. Vratite PPC3 i EPM u skladište.

## Očisti amplificiranu obogaćenu biblioteku

Ovaj korak koristi SPB za pročišćavanje obogaćenih biblioteka od neželjenih reakcijskih komponenti. Zrnca se peru dva puta svježim 80-postotnim etanolom. Biblioteke su eluirane RSB-om.

### Priprema

1. Pripremite sljedeće reagense.
  - SPB – pobrinite se da su zrnca na sobnoj temperaturi 30 minuta. Obavezno koristite **SPB**, a ne **SMB** za ovaj postupak.
  - RSB – stavite sa strane za uporabu u postupku.
2. Pripremite svježi 80-postotni etanol u konusnoj epruveti od 15 ml ili 50 ml.

Tablica 34 Pripremite svježi 80-postotni etanol

Reagens	4 biblioteke	8 biblioteka	16 biblioteka	24 biblioteke	48 biblioteka
100-postotni EtOH, 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. Promiješajte svježi 80-postotni EtOH u vrtložnoj miješalici.
4. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s BIND2 (čišćenje vezivanja).
5. Postavite magnet.

### Postupak

#### Vežite

1. Uklonite pločicu ELU2 PCR s termociklera.
2. Centrifugirajte pločicu ELU2 PCR na 280 × g u trajanju od 1 minute.
3. Miješajte SPB u vrtložnoj miješalici 1 minutu kako biste ponovno suspendirali zrnca.
4. Odmah dodajte 110 µl SPB-a u svaku biblioteku BIND2 MIDI pločice.
5. Prenesite 50 µl iz svake biblioteku ELU2 PCR pločice u odgovarajuću jažicu BIND2 MIDI pločice.
6. Bacite praznu ELU2 PCR pločicu.
7. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na BIND2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
8. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
9. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 5 minuta.
10. Stavite BIND2 MIDI pločicu na magnetni stalak na 5 minuta.
11. Držite pločicu na magnetskom stalku. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.

## Pranje

1. Operite zrnca na sljedeći način.
  - a. Pločicu BIND2 MIDI držite na magnetnom stalku i dodajte 200 µl svježeg 80-postotnog EtOH-a u svaku jažicu.
  - b. Pričekajte 30 sekundi.
  - c. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl, uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.
2. Operite zrnca drugi put.
3. Pomoću pipete s finim vrhovima uklonite preostali EtOH iz svake jažice.
4. Bacite neiskorišteni 80-postotni EtOH.

## Eluiranje

1. Uklonite BIND2 MIDI pločicu s magnetnog stalka.
2. Preokrenite ili promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste pomiješali RSB.
3. Dodajte 32 µl RSB-a u svaku jažicu biblioteke.
4. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na BIND2 MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
5. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
6. Inkubirajte na sobnoj temperaturi 2 minute.
7. Stavite na magnetni stalak 2 minute.
8. Označite novu pločicu PCR s 96 jažica s PL (pročišćene biblioteke).
9. Prenesite 30 µl iz svake jažice BIND2 MIDI pločice u odgovarajuću jažicu PL PCR pločice.
10. Bacite praznu BIND2 MIDI pločicu.
11. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na PL PCR pločicu.
12. Vratite SPB u skladište.

### TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, centrifugirajte PL PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute i pohranite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana. Vratite RSB u pohranu.

## Priprema za korake protokola

1. Izvadite epruvetu s reagensom iz kutije i slijedite upute za odmrzavanje.

Tablica 35 TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto) kutija (PN 20031121)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
LNA1	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Normaliziranje biblioteka
EE2	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu.	Normaliziranje biblioteka

Tablica 36 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (PN 20031123)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
LNB1	2 °C do 8 °C	Ostavite na sobnoj temperaturi 30 minuta.	Normaliziranje biblioteka
HP3	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Normaliziranje biblioteka Priprema za sekvenciranje
LNW1	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Normaliziranje biblioteka
LNS1	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Normaliziranje biblioteka

- Ako isti dan nastavljate s [Priprema za sekvenciranje na stranici 75](#), slijedite upute za odmrzavanje u odjeljku Priprema za korake protokola.

## Normaliziranje biblioteka

Ovaj postupak koristi LNB1 uz dodatak aditiva (LNA1) za normalizaciju količine svake biblioteka kako bi se osigurala ujednačena zastupljenost biblioteka u objedinjenim bibliotekama. Zrnca se peru dvaput s LNW1. Biblioteka se eluiraju pomoću svježe mješavine za eluiranje EE2 + HP3 i neutraliziraju pomoću LNS1.

### Priprema

- Pripremite sljedeće reagense.
  - LNB1 – Pobrinite se da su zrnca na sobnoj temperaturi 30 minuta.
  - LNA1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici.
  - EE2 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - HP3 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
  - LNW1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Stavite sa strane za uporabu u postupku.
  - LNS1 – Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Stavite sa strane za uporabu u postupku.
- Miješajte LNB1 u vrtložnoj miješalici 1 minutu kako biste ponovno suspendirali zrnca. Preokrenite LNB1 epruvetu kako biste bili sigurni da su sva zrnca ponovno suspendirana.
- Pomoću pipete postavljene na 800 µl, pipetirajte LNB1 gore-dolje 10 puta kako biste osigurali resuspenziju.

4. Odmah pripremite svježu glavnu mješavinu LNA1 + LNB1 u konusnoj epruveti.

**OPREZ**

Potpuno resuspendirajte kuglicu zrnca LNB1 na dnu epruvete kako biste spriječili nedosljednu gustoću klastera.

Tablica 37 Glavna mješavina LNA1 + LNB1\*

Komponenta glavne mješavine	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 tablica uključuje prekomjerni volumen. Izračune potražite u odjeljku [Rukovanje reagensima na stranici 34.](#)

5. U vrtložnoj miješalici promiješajte glavnu mješavinu LNA1 + LNB1. Stavite na stranu za korak [Vežite na stranici 72.](#)
6. Pripremite svježu mješavinu za eluiranje EE2 + HP3 u epruveti za mikrocentrifugu.

Tablica 38 Mješavina za eluiranje EE2 + HP3 za normalizaciju biblioteka\*

Komponenta mješavine za eluiranje	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 tablica uključuje prekomjerni volumen. Izračune potražite u odjeljku [Rukovanje reagensima na stranici 34.](#)

7. Promiješajte svježu mješavinu za eluiranje u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte. Stavite na stranu za korak [Eluiranje na stranici 73.](#)
8. Ako je PL PCR pločica pohranjena, odmrznite na sobnu temperaturu, centrifugirajte na 280 × g u trajanju od 1 minute. Pomiješajte pipetiranjem.
9. Označite novu MIDI pločicu s 96 jažica s BBN (normalizacija temeljena na zrcima).
10. Postavite magnet.

## Postupak

### Vežite

- U vrtložnoj miješalici promiješajte glavnu mješavinu LNA1 + LNB1.
- Odmah dodajte 45 µl glavne mješavine LNA1 + LNB1 svakoj jažici biblioteka BBN MIDI pločice.
- Bacite preostalu glavnu mješavinu LNA1 + LNB1.
- Dodajte 20 µl svake biblioteka iz PL PCR pločice u odgovarajuću jažicu BBN MIDI pločice.
- Nanesite ljepljivu brtvu pločice na BBN MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
- Tresite pri 1800 o/min 30 minuta.



7. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na PL PCR pločicu i vratite je u pohranu.
8. Stavite BIND1 MIDI pločicu na magnetni stalak na 2 minute.
9. Držite pločicu na magnetskom stalku. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.

## Pranje

1. Operite zrnca na sljedeći način.
  - a. Uklonite BBN MIDI pločicu s magnetnog stalka.
  - b. Dodajte 45 µl LNW1 u svaku jažicu biblioteke.
  - c. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na BBN MIDI pločicu.
  - d. Potpuno zatvorite rubove i jažice.
  - e. Tresite pri 1800 o/min 5 minuta.
  - f. Stavite BIND1 MIDI pločicu na magnetni stalak na 2 minute.
  - g. Držite pločicu na magnetskom stalku. Bez ometanja kuglice zrnca, pomoću pipete postavljene na 200 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.
2. Operite zrnca *drugi* put.
3. Pomoću pipete s finim vrhovima uklonite preostali supernatant iz svake jažice.

## Eluiranje

1. Uklonite BBN MIDI pločicu s magnetnog stalka.
2. Promiješajte svježu mješavinu za eluiranje EE2 + HP3 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
3. Dodajte 32 µl otopine EE2 + HP3 u svaku jažicu biblioteke BBN MIDI pločice.
4. Bacite preostalu mješavinu za eluiranje.
5. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na BBN MIDI pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
6. Tresite pri 1800 o/min 2 minute.
7. Stavite na magnetni stalak 2 minute.
8. Označite novu PCR pločicu s 96 jažica s NL (normalizirane biblioteke).
9. Pažljivo prenesite 30 µl iz svake jažice biblioteke BBN MIDI pločice u odgovarajuću jažicu NL PCR pločice.



### OPREZ

Ako se zrnca aspiriraju u vrhove pipeta, vratite ih u pločicu na magnetnom stalku i pričekajte da se tekućina izbistri (~2 minute) prije prelaska na sljedeći korak postupka.

10. Bacite praznu BBN MIDI pločicu.
11. Promiješajte LNS1 u vrtložnoj miješalici.
12. Dodajte 30 µl LNS1 u svaku jažicu biblioteke u novoj NL PCR pločici.

13. Pipetirajte pet puta kako biste promiješali.
14. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na NL PCR pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
15. Vratite LNB1, LNA1, EE2, LNW1 i LNS1 u pohranu.

### TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja, centrifugirajte NL PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute i pohranite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.

## Priprema za korake protokola

Započnite pripremu potrošnog materijala za sekvenciranje iz kompleta reagensa NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa) (PN 20028871) najmanje sat vremena prije uporabe.

1. Uklonite pufer za razrjeđivanje biblioteke (HT1) iz pohrane na temperaturi od -25 °C do -15 °C. Odmrznite na sobnu temperaturu i održavajte hladnim.
2. Slijedite upute za pripremu u *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 100000009513)* za ostale 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 s reagensom iz kutije i slijedite upute za odmrzavanje.

Tablica 39 TruSight Oncology Comp Enrichment (zamrznuto) kutija (PN 20031121)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
PhiX Internal Control (PX3 ili PhiX)	od -25 °C do -15 °C	Odmrznite na sobnu temperaturu. Držite na hladnom.	Priprema za sekvenciranje

Tablica 40 TruSight Oncology Comp Enrichment (rashlađeno) kutija (PN 20031123)

Reagens	Skladištenje	Upute za odmrzavanje	Korak protokola
HP3	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Priprema za sekvenciranje
RSB (ružičasta naljepnica)	2 °C do 8 °C	Dovedite na sobnu temperaturu.	Priprema za sekvenciranje

## Priprema za sekvenciranje

### Priprema

1. Pregledajte smjernice za [Broj biblioteka i odabir indeksa na stranici 37](#).
2. Označite epruvetu za mikrocentrifugu s dHP3 (razrijeđeni HP3).
3. Označite epruvetu za mikrocentrifugu s dPhiX (razrijeđeni PhiX).
4. Zagrijte toplinski blok na 96 °C za epruvete za mikrocentrifugu.
5. Pripremite posudu s ledom ili ekvivalentnu posudu.

### Razrijedite i denaturirajte PhiX kontrolu

1. Promiješajte HP3 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
2. Pomiješajte sljedeće volumene u dHP3 epruveti za mikrocentrifugu.
  - 10 µl HP3
  - 190 µl RNase/DNase-free water
3. Promiješajte dHP3 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
4. Preokrenite ili promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste promiješali RSB.
5. Promiješajte PhiX kontrolu u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
6. Pomiješajte sljedeće volumene u dPhiX epruveti za mikrocentrifugu.
  - 8 µl RSB
  - 2 µl PhiX kontrola
7. Dodajte 10 µl dHP3 u epruvetu dPhiX.
8. Bacite epruvetu dHP3.
9. Promiješajte dPhiX u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
10. Inkubirajte dPhiX na sobnoj temperaturi 5 minuta kako biste denaturirali.
11. Miješajte HT1 u vrtložnoj miješalici kako biste promiješali.
12. Odmah dodajte 980 µl prethodno ohlađenog HT1 u dPhiX.
13. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
14. Držite PhiX na hladnom do uporabe u pripremi za drugo razrjeđivanje.  
Konačna koncentracija je 20 pM dPhiX.
15. Vratite PhiX, HP3 i RSB u skladište.

### Objedinjavanje i denaturiranje biblioteke za TSO Comprehensive (EU)

1. Ako je pločica za NL PCR bila pohranjena, otopite je na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugirajte pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute.

2. Pomoću višekanalne pipete postavljene na 30 µl, nježno pipetom promiješajte biblioteke u NL PCR pločici pet puta.

Koristite svježe vrhove za svaku biblioteku.



## OPREZ

Pobrinite se da dobro promiješate biblioteke za optimalnu učinkovitost.

3. Odaberite jednu od sljedećih opcija za objedinjavanje, denaturiranje i razrjeđivanje biblioteka.
  - **Opcija 1:** Istovremeno sekvencirajte biblioteke izvedene iz uzoraka RNK-a i uzoraka DNK-a. Pogledajte odjeljak [Opcija 1: DNK i RNK biblioteke zajedno na stranici 76](#).
  - **Opcija 2:** Biblioteke sekvenciranja dobivene samo iz uzoraka DNK-a. Pogledajte odjeljak [Opcija 2: Samo DNK biblioteke na stranici 77](#).
  - **Opcija 3:** Biblioteke sekvenciranja dobivene samo iz uzoraka RNK-a. Pogledajte odjeljak [Opcija 3: Samo RNK biblioteke na stranici 78](#).

## Opcija 1: DNK i RNK biblioteke zajedno

1. Označite epruvetu za mikrocentrifugu s PRL (objedinjene RNK biblioteke).
2. Označite epruvetu za mikrocentrifugu s PDL (objedinjene DNK biblioteke).
3. Prenesite 10 µl od svake normalizirane RNK biblioteke (cDNK) s pločice NL u epruvetu PRL. Nemojte objedinjavati dvije biblioteke s istom početnicom za indeksiranje.
4. Prenesite 10 µl od svake normalizirane DNK biblioteke s NL pločice u PDL epruvetu. Nemojte objedinjavati dvije biblioteke s istom početnicom za indeksiranje.
5. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na NL PCR pločicu. Potpuno zatvorite rubove i jažice.
6. Promiješajte epruvete PRL i PDL u vrtložnoj miješalici.
7. Nakratko centrifugirajte PRL i PDL epruvete.
8. Inkubirajte PRL i PDL epruvete u toplinskom bloku na 96 °C u trajanju od 2 minute.
9. Držite PRL i PDL epruvete na hladnom 5 minuta.
10. Promiješajte PRL i PDL epruvete u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
11. Držite epruvete PRL i PDL na hladnom.

## Pripremite prvo razrjeđivanje

1. Označite epruvetu za mikrocentrifugu s DIL1 (Razrjeđivanje 1).
2. Prenesite 20 µl PDL-a u praznu epruvetu DIL1.
3. Dodajte 5 µl PRL-a u DIL1.
4. Bacite PDL i PRL epruvete.
5. Dodajte 475 µl prethodno ohlađenog HT1 u epruvetu DIL1 (razrjeđivanje 1:20).

6. Promiješajte epruvetu DIL1 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

### Pripremite drugo razrjeđivanje

1. Označite epruvetu za mikrocentrifugu od 2,0 ml s DIL2 (Razrjeđivanje 2).
2. Prenesite 40 µl DIL1 u praznu epruvetu DIL2.
3. Bacite epruvetu DIL1.
4. Dodajte 1660 µl prethodno ohlađenog HT1 u epruvetu DIL2 (razrjeđivanje 1:850).
5. Pripremite miješanjem u vrtložnoj miješalici 20 pM dPhiX, a zatim nakratko centrifugirajte.
6. Dodajte 2,5 µl pripremljenog 20 pM dPhiX u epruvetu DIL2.
7. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
8. Umetnite 1300 µl DIL2 u odmrznuti uložak NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklusa)  
Za više informacija pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)*.
9. Bacite epruvetu DIL2.
10. Centrifugirajte NL PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute, a zatim čuvajte na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.
11. Prijedite na sekvenciranje.  
Za više informacija pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)*.

### Opcija 2: Samo DNK biblioteke

1. Označite gornji navoj epruvete za mikrocentrifugu s PDL (objedinjene DNK biblioteke).
2. Prenesite 10 µl od svake normalizirane DNK biblioteke s NL pločice u PDL epruvetu.  
Nemojte objedinjavati dvije biblioteke s istom početnicom za indeksiranje.
3. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na NL PCR pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice.
4. Promiješajte PDL epruvetu u vrtložnoj miješalici.
5. Nakratko centrifugirajte PDL epruvetu.
6. Inkubirajte PDL epruvetu u toplinskom bloku na 96 °C u trajanju od 2 minute.
7. Držite PDL epruvetu na hladnom 5 minuta.
8. Promiješajte PDL epruvetu u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
9. Držite PDL epruvetu na hladnom.

### Pripremite prvo razrjeđivanje

1. Označite epruvetu za mikrocentrifugu s DIL1 (Razrjeđivanje 1).
2. Prenesite 10 µl PDL-a u praznu epruvetu DIL1.
3. Bacite PDL epruvetu.
4. Dodajte 190 µl prethodno ohlađenog HT1 u epruvetu DIL1 (razrjeđivanje 1:20).
5. Promiješajte DIL1 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

### Pripremite drugo razrjeđivanje

1. Označite epruvetu za mikrocentrifugu od 2,0 ml s DIL2 (Razrjeđivanje 2).
2. Prenesite 40 µl DIL1 u praznu epruvetu DIL2.
3. Bacite epruvetu DIL1.
4. Dodajte 1660 µl prethodno ohlađenog HT1 u epruvetu DIL2 (razrjeđivanje 1:850).
5. Pripremite u vrtložnoj miješalici 20 pM dPhiX, a zatim nakratko centrifugirajte.
6. Dodajte 2,5 µl pripremljenog 20 pM dPhiX u epruvetu DIL2.
7. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
8. Umetnite 1300 µl DIL2 u odmrznuti uložak NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklusa).  
Za više informacija pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)*.
9. Bacite epruvetu DIL2.
10. Centrifugirajte NL PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute, a zatim čuvajte na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.
11. Prijedite na sekvenciranje.  
Za više informacija pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)*.

### Opcija 3: Samo RNK biblioteke

1. Označite epruvetu za mikrocentrifugu s PRL (objedinjene RNK biblioteke).
2. Prenesite 10 µl od svake normalizirane RNK biblioteke (cDNK) s pločice NL u epruvetu PRL.  
Nemojte objedinjavati dvije biblioteke s istom početnicom za indeksiranje.
3. Nanesite ljepljivu brtvu pločice na NL PCR pločicu.  
Potpuno zatvorite rubove i jažice kako biste spriječili isparavanje.
4. Promiješajte PRL epruvetu u vrtložnoj miješalici.
5. Nakratko centrifugirajte PRL epruvetu.
6. Inkubirajte PRL epruvetu u toplinskom bloku na 96 °C u trajanju od 2 minute.
7. Držite PRL epruvetu na hladnom 5 minuta.

8. Promiješajte PRL epruvetu u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
9. Držite PRL epruvetu na hladnom.

### Pripremite prvo razrjeđivanje

1. Označite epruvetu za mikrocentrifugu s DIL1 (Razrjeđivanje 1).
2. Prenesite 10 µl PRL-a u praznu epruvetu DIL1.
3. Bacite PRL epruvetu.
4. Dodajte 190 µl prethodno ohlađenog HT1 u epruvetu DIL1 (razrjeđivanje 1:20).
5. Promiješajte DIL1 u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

### Pripremite drugo razrjeđivanje

1. Označite epruvetu za mikrocentrifugu od 2,0 ml s DIL2 (Razrjeđivanje 2).
2. Prenesite 40 µl DIL1 u praznu epruvetu DIL2.
3. Bacite epruvetu DIL1.
4. Dodajte 1646 µl prethodno ohlađenog HT1 u epruvetu DIL2 (razrjeđivanje 1:843).
5. Pripremite u vrtložnoj miješalici 20 pM dPhiX, a zatim nakratko centrifugirajte.
6. Dodajte 16,7 µl pripremljenog 20 pM dPhiX u epruvetu DIL2.
7. Promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
8. Umetnite 1300 µl DIL2 u odmrznuti uložak NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 ciklusa).  
Za više informacija pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)*.
9. Bacite epruvetu DIL2.
10. Centrifugirajte NL PCR pločicu na 280 × g u trajanju od 1 minute i čuvajte je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 30 dana.
11. Prijedite na sekvenciranje.  
Za više informacija pogledajte *Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta 1000000009513)*.

# Tumačenje rezultata

Rezultati sekvenciranja iz TSO Comprehensive (EU) analize prikazuju se za svaki uzorak pojedinačno u PDF izvješću i JSON izvješću. Izvješće o niskoj dubini (`LowDepthReport.tsv`) također se generira na razini uzorka.

Na razini obrade, generiraju se sljedeće izlazne datoteke:

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

U PDF i JSON izvješćima pojavljuju se samo varijante koje zadovolje kontrolu kvalitete.

Detaljne informacije o analizi potražite u dokumentu *Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)* (broj dokumenta 200008661).

## Rezultati popratne dijagnostike

Za svaku namjenu popratne dijagnostike (CDx) postoje tri moguća rezultata:

- **Pozitivno** – Varijanta ili biomarker su otkriveni i klasificirani kao razina 1 (CDx).
- **Nije otkriveno** – U uzorku nisu otkrivene varijante ili biomarkeri povezani s namjenom CDx-a. Vrsta tumora odabrana za uzorak prikladna je za CDx.
- **Nema rezultata** – Određivanje statusa varijante nije moguće iz jednog ili više sljedećih razloga:
  - Namjena CDx-a nije primjenjiva na testirani uzorak jer vrsta tumora odabrana za uzorak nije prikladna za vrstu tumora CDx-a.
  - Obrada sekvenciranjem nije zadovoljila specifikacije kontrole kvalitete.
  - Biblioteka nije zadovoljila specifikacije kontrole kvalitete.
  - Nije obrađena odgovarajuća nukleinska kiselina.

Svi rezultati za namjenu CDx-a navedeni su u odjeljku Rezultati popratne dijagnostike u JSON izvješću. Samo namjene s pozitivnim rezultatom navedene su u odjeljku Rezultati popratne dijagnostike u PDF izvješću.

## Varijante profiliranja tumora

TSO Comprehensive (EU) je dizajniran za prijavu somatskih varijanti prilikom prijavljivanja varijanti s dokazima od kliničkog značaja ili varijanti s potencijalnim kliničkim značajem. Softver za analizu TSO Comprehensive (EU) koristi KB koji određuje je li svaka otkrivena i prihvatljiva varijanta ([Tablica 2](#)) klinički značajna ili potencijalno klinički značajna na temelju dokaza o terapijskim, dijagnostičkim ili prognostičkim povezivanjima. KB također razmatra jesu li povezivanja uspostavljena (ili ne) u testiranom tipu tumora. U KB nisu uključena povezivanja s osjetljivošću ili rizikom od raka. Uklonjeni su uobičajeni polimorfizmi.



Za varijante profiliranja tumora pozitivni rezultati razvrstavaju se u Genomske nalaze s dokazima kliničkog značaja (razina 2) ili Genomske nalaze s potencijalnim kliničkim značajem (razina 3) prema instaliranom KB-u i utvrđenom tipu tumora.

Neuspješne kontrole kvalitete ne dovode do rezultata za vrste varijanti koje su relevantne za mjerne podatke neuspješne kontrole kvalitete. Za više informacija, pogledajte [Tablica 41](#) i [Tablica 42](#). Položaji profiliranja tumora s nedovoljnom dubinom navedeni su u Izvješću o niskoj dubini, a ne u TSO Comprehensive (EU) izvješću.

## Kontrola kvalitete

- Informacije o kvantifikaciji nukleinske kiseline i zahtjeve za minimalnim ulaznim materijalima potražite u odjeljku [Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27](#).
- Obrada sekvenciranjem i valjanost uzorka određuju se automatski i o njima izvješćuje Modul za analizu TSO Comprehensive (EU). Detaljne informacije o analizi potražite u dokumentu *Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (broj dokumenta 200008661)*.
- TSO Comprehensive (EU) izvješće, dostupno u PDF i JSON formatima, sažima rezultate kontrole kvalitete. Izvješća se nalaze u mapi analize. Pogledajte Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (broj dokumenta 200008661) za lokaciju mape analize (sadrži PDF i JSON izvješća) i mapu obrade.

Tablica 41 TSO Comprehensive (EU) Rezultati izvješća o mjernim podacima kontrole kvalitete

Vrsta izlaza	Mjerni podaci	Specifikacija	Opis	Utjecaj neuspjeha specifikacije*
Obrada sekvenciranjem	PCT_PF_READS (%)	≥ 80,0	Postotak očitavanja koja prolaze filter (PF).	Obrada sekvenciranjem nije valjana. Nisu prijavljeni rezultati za nijedan uzorak u obradi.
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80,0	Prosječan postotak otkrivanja baza s rezultatom kvalitete od Q30 ili višim za Očitavanje 1.	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80,0	Prosječan postotak otkrivanja baza s rezultatom kvalitete od Q30 ili višim za Očitavanje 2.	

Vrsta izlaza	Mjerni podaci	Specifikacija	Opis	Utjecaj neuspjeha specifikacije*
DNK biblioteke	CONTAMINATION_SCORE	$\leq 3106$ ILI $> 3106$ i P_ VALUE $\leq$ 0,049	Mjerni podatak koji procjenjuje vjerojatnost kontaminacije pomoću VAF-a uobičajenih varijanti. Rezultat kontaminacije temelji se na VAF distribuciji SNP-ova. P vrijednost kontaminacije koja se koristi za procjenu visoko preuređenih genoma, primjenjuje se samo kada je rezultat kontaminacije iznad gornje navedene granice.	Nisu prijavljeni rezultati DNK-a.
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	$\geq 70$	Medijan dužine fragmenta u uzorku.	Nisu prijavljeni rezultati za TMB ili male varijante DNK-a.
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (broj)	$\geq 150$	Medijan pokrivenosti fragmenta egzona u svim bazama egzona.	
	PCT_EXON_50X (%)	$\geq 90,0$	Postotak baza egzona s pokrivenošću fragmenta od 50X.	
	USABLE_MSI_SITES (broj)	$\geq 40$	Broj MSI lokacija koje se mogu koristiti za MSI otkrivanja (broj mikrosatelitskih mjesta s dovoljnim rasponom očitavanja za identifikaciju nestabilnosti mikrosatelita).	Nisu prijavljeni rezultati MSI-a.
	COVERAGE_MAD (broj)	$\leq 0,210$	Medijan apsolutnih odstupanja od medijana normaliziranog broja svake ciljane regije CNV-a.	Nisu prijavljeni rezultati amplifikacije gena.
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (broj)	$\geq 1,0$	Medijan neobrađenog broja spremnika po CNV cilju.	

Vrsta izlaza	Mjerni podaci	Specifikacija	Opis	Utjecaj neuspjeha specifikacije*
RNK biblioteke	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	$\geq 80,0$	Medijan dužine fragmenta u uzorku.	Nisu prijavljeni rezultati fuzija ili varijanti spajanja.
	MEDIAN_CV_GENE_500X (koeficijent)	$\leq 0,93$	MEDIAN_CV_GENE_500X je mjera ujednačenosti pokrivenosti. Za svaki gen s najmanje 500x pokrivenosti, izračunava se koeficijent varijacije u pokrivenosti cijelog tijela gena. Taj je mjerni podatak medijan tih vrijednosti. Visoka vrijednost ukazuje na visoku razinu varijacije i ukazuje na problem u pripremi biblioteke kao što je nizak unos uzorka i/ili problemi s izvlačenjem sonde. Taj se mjerni podatak izračunava pomoću svih očitavanja (uključujući očitavanja označena kao duplikati).	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (broj)	$\geq 9.000.000$	Ukupan broj očitavanja koja se mapiraju prema ciljanim regijama. Taj se mjerni podatak izračunava pomoću svih očitavanja (uključujući očitavanja označena kao duplikati).	

\* Uspješni rezultati pokazuju PASS (ZADOVOLJAVA).

Tablica 42 TSO Comprehensive (EU) Mjerni podaci kontrole rezultata izvješća

Vrsta izlaza	Mjerni podaci	Specifikacija	Utjecaj neuspjeha specifikacije*
Pozitivna kontrola	Vanjska kontrola DNK-a	Otkriveno je 23 od 24 navedene varijante	Ručno poništite uzorke bolesnika na temelju rezultata kontrolnog uzorka. Softver modula za analizu ne poništava automatski uzorke bolesnika na temelju rezultata kontrolnog uzorka.
	Vanjska kontrola RNK-a	Otkriveno je 12 od 13 navedenih varijanti	
Kontrola bez predložka	DNK Srednja pokrivenost egzona za TSO Comprehensive (EU)	$\leq 8$	Ručno poništite uzorke bolesnika na temelju rezultata kontrolnog uzorka. Softver modula za analizu ne poništava automatski uzorke bolesnika na temelju rezultata kontrolnog uzorka.
	RNK gen iznad granične vrijednosti medijana	$\leq 1$	

\* Uspješni rezultati pokazuju PASS (ZADOVOLJAVA).

- Ponovite obrade sekvenciranjem koje su nevažeće.
- Ponovite testove biblioteka sa sljedećim rezultatima:
  - Kontaminirane DNK biblioteke
  - Nevažeće RNK biblioteke
  - Testovi se mogu ponoviti kako bi se dobilo više rezultata varijanti ili biomarkera za DNK biblioteke koje su proglašene nevažećima za jednu, ali ne za sve vrste varijanti.
- Pozitivne kontrole procjenjuju se za otkrivanje varijanti. Ako pozitivne kontrole ne zadovoljavaju specifikacije otkrivanja varijanti, ručno poništite obradu sekvenciranjem. Softver modula za analizu ne poništava automatski uzorke bolesnika na temelju rezultata kontrolnog uzorka.
- NTC-ovi se procjenjuju prema medijanu pokrivenosti egzona za DNK i gene iznad granične vrijednosti medijana za RNK. Ako negativne kontrole ne zadovoljavaju specifikacije, ručno poništite događaj pripreme biblioteke i sve povezane obrade sekvenciranjem. Softver modula za analizu ne poništava automatski uzorke bolesnika na temelju rezultata kontrolnog uzorka.
- Provedite dodatne mjere kontrole kvalitete u skladu s lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima ili zahtjevima akreditiranja.

Više informacija o ponavljanju obrada sekvenciranjem ili testova biblioteka potražite u odjeljku [Otklanjanje poteškoća na stranici 85](#).

## Otklanjanje poteškoća

Pomoću sljedeće tablice riješite probleme u tijeku rada. Ako obrada sekvenciranjem ili priprema biblioteke za uzorak ne uspije dva puta, možda će biti potrebno dodatno rješavanje problema. Obratite se tehničkoj podršci tvrtke Illumina.

Promatranje	Mogući uzrok	Preporučena radnja
Obrada sekvenciranjem ne zadovoljava specifikacije kontrole kvalitete obrade.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Pogreška grupiranja uzoraka</li> <li>Pogreška razrjeđivanja</li> <li>Nepotpuna toplinska denaturacija PRL/PDL-a</li> <li>Problemi s pripremom potrošnog materijala za sekvenciranje (na primjer, nije se primjereno odmrznulo, kondenzacija/ostaci na protočnoj stanici)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ponovno sekvencirajte biblioteke s PCR pločice normalizirane biblioteke (NL). Pogledajte odjeljak <a href="#">Priprema za sekvenciranje na stranici 75</a>.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>Neispravna uporaba sonde za obogaćivanje (na primjer, sonde OPR1 koje se koriste za uzorke DNK-a, sonde OPD2 koje se koriste za uzorke RNK-a)</li> <li>Pogreška u tijeku rada pripreme biblioteke tijekom ili nakon prvog koraka hibridizacije.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ponovno obogatite biblioteke s PCR pločice amplificiranih uzoraka biblioteka (ALS). Pogledajte odjeljak <a href="#">Postavljanje prve hibridizacije na stranici 59</a>.</li> </ul>

Promatranje	Mogući uzrok	Preporučena radnja
	Zahtjevi za unos uzorka nisu ispunjeni	Započnite pripremu biblioteke od početka tijeka rada. Pogledajte odjeljak <a href="#">Denaturirajte i zagrijte RNK na stranici 45</a> ili <a href="#">Fragmentiranje gDNK-a na stranici 50</a> .
	Pogreška u tijeku rada pripreme biblioteke tijekom ili prije koraka indeksiranja PCR-a	Ponovno obogatite biblioteke s PCR pločice amplificiranih uzoraka biblioteka (ALS). Pogledajte odjeljak <a href="#">Postavljanje prve hibridizacije na stranici 59</a> .
	Problem s instrumentom	Obratite se Illumina tehničkoj podršci.
Pogreška u generiranju izvješća ili opća pogreška instrumenta (mrežna pogreška, pogreške prilikom umetanja/vađenja reagensa itd.).	Problem sa softverom ili instrumentom.	Pogledajte Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU) (broj dokumenta 200008661) za pomoć s generiranjem izvješća. Obratite se Illumina tehničkoj podršci za dodatnu pomoć.
DNK biblioteka ne zadovoljava specifikacije kontrole kvalitete.	Zahtjevi za unos uzorka nisu ispunjeni.	Osigurajte odgovarajući unos uzorka i ponovite pripremu biblioteke iz koraka Fragmentiranje gDNK-a. Pogledajte odjeljak <a href="#">Zahtjevi za uzorke na stranici 27</a> i <a href="#">Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27</a> .

Promatranje	Mogući uzrok	Preporučena radnja
	Pogreška uporabe ili opreme u tijeku rada analize.	<p>Ponovite pripremu biblioteke iz jednog od sljedećih koraka ovisno o tome gdje se sumnja na pogrešnu upotrebu ili pogrešku opreme. Ako je došlo do nepoznatih ili drugih pogrešaka, obratite se Illumina tehničkoj podršci za rješavanje problema s obradom.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ponovno sekvencirajte biblioteke s PCR pločice normalizirane biblioteke (NL). Pogledajte odjeljak <a href="#">Priprema za sekvenciranje na stranici 75</a>.</li> <li>Ponovno obogatite biblioteke s PCR pločice amplificiranih uzoraka biblioteka (ALS). Pogledajte odjeljak <a href="#">Postavljanje prve hibridizacije na stranici 59</a>.</li> <li>Započnite pripremu biblioteke od početka tijeka rada. Pogledajte odjeljak <a href="#">Fragmentiranje gDNK-a na stranici 50</a>.</li> </ul>
	CONTAMINATION_SCORE, CONTAMINATION_P_VALUE kriteriji nisu zadovoljeni.	<p>Informacije o izbjegavanju križne kontaminacije potražite u upozorenjima i mjerama opreza. Pregledajte raspored pločica i indeksiranje biblioteke kako bi se osiguralo da biblioteke istog indeksa nisu sekvencirane zajedno. Za pogođene biblioteke, započnite pripremu biblioteke od početka tijeka rada. Pogledajte odjeljak <a href="#">Fragmentiranje gDNK-a na stranici 50</a>. Možda je došlo do kontaminacije tijekom ekstrakcije uzorka. Možda će biti potrebno ponoviti ekstrakciju kako biste bili sigurni da uzorak nije kontaminiran.</p>
DNK biblioteka ne zadovoljava specifikacije kontrole kvalitete (nastavak).	Upotrebljivi MSI nije uspio.	<p>Pregledajte postavke proizvođača ultrazvučnog uređaja za uporabu i rad (uključujući razinu vode i vrstu epruvete). Osigurajte odgovarajući unos uzorka u analizu. Pogledajte odjeljak <a href="#">Zahtjevi za uzorke na stranici 27</a> i <a href="#">Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27</a>. Možda će biti potrebna nova ekstrakcija i/ili ponavljanje koraka fragmentacije gDNK-a ako je uzorak pretjerano fragmentiran ili oštećen.</p>

Promatranje	Mogući uzrok	Preporučena radnja
	Uzorak može biti pretjerano fragmentiran ili imati oštećenje nukleinske kiseline koje utječe na sposobnost stvaranja dovoljnih jedinstvenih biblioteka.	Pregledajte <a href="#">Postavke konfiguracije ultrazvučnog uređaja za fragmentaciju DNK-a na stranici 25</a> i postavke proizvođača ultrazvučnog uređaja za uporabu i rad (uključujući razinu vode i vrstu cijevi). Osigurajte odgovarajući unos uzorka u analizu. Pogledajte odjeljak <a href="#">Zahtjevi za uzorke na stranici 27</a> i <a href="#">Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27</a> . Možda će biti potrebna nova ekstrakcija i/ili ponavljanje koraka fragmentacije gDNK-a ako je uzorak pretjerano fragmentiran ili oštećen.
RNK biblioteka ne zadovoljava specifikacije kontrole kvalitete.	Zahtjevi za unos uzorka nisu ispunjeni.	Osigurajte odgovarajući unos uzorka i ponovite pripremu biblioteke iz koraka Denaturiranje i zagrijavanje RNK-a. Pogledajte odjeljak <a href="#">Zahtjevi za uzorke na stranici 27</a> i <a href="#">Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27</a> .
RNK biblioteka ne zadovoljava specifikacije kontrole kvalitete.	Pogreška uporabe ili opreme u tijeku rada analize.	Ponovite pripremu biblioteke iz jednog od sljedećih koraka ovisno o tome gdje se sumnja na pogrešnu upotrebu ili pogrešku opreme. Ako je došlo do nepoznatih ili drugih pogrešaka, obratite se Illumina tehničkoj podršci za rješavanje problema s obradom. <ul style="list-style-type: none"> <li>Ponovno sekvencirajte biblioteke s PCR pločice normalizirane biblioteke (NL). Pogledajte odjeljak <a href="#">Priprema za sekvenciranje na stranici 75</a>.</li> <li>Ponovno obogatite biblioteke s PCR pločice amplificiranih uzoraka biblioteka (ALS). Pogledajte odjeljak <a href="#">Postavljanje prve hibridizacije na stranici 59</a>.</li> <li>Započnite pripremu biblioteke od početka tijeka rada. Pogledajte odjeljak <a href="#">Denaturirajte i zagrijte RNK na stranici 45</a>.</li> </ul>



Promatranje	Mogući uzrok	Preporučena radnja
	Uzorak može biti pretjerano fragmentiran ili imati oštećenje nukleinske kiseline koje utječe na sposobnost stvaranja dovoljnih jedinstvenih biblioteka.	Osigurajte odgovarajući unos uzorka. Pogledajte odjeljak <a href="#">Zahtjevi za uzorke na stranici 27</a> i <a href="#">Ekstrakcija, kvantifikacija i pohrana nukleinske kiseline na stranici 27</a> . Možda će biti potrebna nova ekstrakcija uzorka ako je uzorak pretjerano fragmentiran ili oštećen.
Neuspješna pozitivna kontrola (DNK/RNK).	Zahtjevi za unos uzorka za pozitivnu kontrolu nisu ispunjeni.	Osigurajte odgovarajući unos u analizu. Pregledajte raspored pločica i provjerite jesu li odgovarajući reagensi (sonde, indeksi) u odgovarajućim jažicama. Pobrinite se da je uzorak pozitivne kontrole pohranjen u skladu s oznakom. Za sve uzorke koji dijele pozitivnu kontrolu, ponovite pripremu biblioteka iz jednog od sljedećih koraka ovisno o tome gdje se sumnja na pogrešnu uporabu ili pogrešku opreme. Ako je došlo do nepoznatih ili drugih pogrešaka, obratite se Illumina tehničkoj podršci za rješavanje problema s obradom.
	Pogreška uporabe ili opreme u tijeku rada analize.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ponovno sekvencirajte biblioteka s PCR pločice normalizirane biblioteka (NL). Pogledajte odjeljak <a href="#">Priprema za sekvenciranje na stranici 75</a>.</li> <li>• Ponovno obogatite biblioteka s PCR pločice amplificiranih uzoraka biblioteka (ALS). Pogledajte odjeljak <a href="#">Postavljanje prve hibridizacije na stranici 59</a>.</li> <li>• Započnite pripremu biblioteka od početka tijeka rada. Pogledajte odjeljak <a href="#">Denaturirajte i zagrijte RNK na stranici 45</a> ili <a href="#">Fragmentiranje gDNK-a na stranici 50</a>.</li> </ul>

Promatranje	Mogući uzrok	Preporučena radnja
Neuspješan NTC (DNK/RNK).	Došlo je do križne kontaminacije ili kontaminacije radnog područja.	Pogledajte odjeljak Upozorenja i mjere opreza za informacije o dekontaminaciji radnih područja i izbjegavanju križne kontaminacije. Pregledajte raspored pločica i indeksiranje biblioteke kako bi se osiguralo da biblioteke istog indeksa nisu sekvencirane zajedno. Ponovite pripremu biblioteke od početka tijeka rada za sve biblioteke koje dijele kontrolu bez predloška.
	Netočno indeksiranje biblioteke.	
Softver pokazuje da pozitivne i/ili negativne kontrole nisu uključene u obradu sekvenciranjem.	Netočna dodjela vrste tumora u planiranju Local Run Manager obrade.	Ponovno stavite analizu u red čekanja s kontrolama koje su ispravno identificirane prema uputama u Vodiču za tijek rada modula za analizu (pogledajte <i>Modul za analizu Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive (EU)</i> (broj dokumenta 200008661)).

## Karakteristike radnih svojstava

TSO Comprehensive (EU) je ciljani NGS panel s 517 gena. Male varijante DNK-a – pojedinačne varijante nukleotida (SNV-ovi), višestruke varijante nukleotida (MNV-ovi), insercije i delecije – ispunjavaju uvjete za izvješćivanje iz svih 517 gena. Amplifikacije gena ispunjavaju uvjete za izvješćivanje iz gena MET i ERBB2. Fuzije ispunjavaju uvjete za izvješćivanje iz 23 gena. Varijante spajanja ispunjavaju uvjete za izvješćivanje iz gena MET i EGFR. Za izvješćivanje, moraju se otkriti varijante i imati dokaze u TSO Comprehensive (EU) analizi KB-a te biti prihvatljive na temelju testirane vrste tkiva. Za izvješćivanje, NTRK fuzije zahtijevaju da fuzijski partner bude 5', a domena NTRK kinaze netaknuta.

Za male varijante DNK-a proveden je reprezentativni pristup utvrđivanja valjanosti ciljanih gena u panelu s podacima koji predstavljaju SNV-ove, MNV-ove, insercije i delecije. Za amplifikacije gena, fuzije i varijante spajanja, testiranje je provedeno na razini gena. TMB i MSI procijenjeni su gdje je naznačeno. Za zahtjeve CDx-a za NTRK fuzije, fuzije u FFPE uzorcima testirane su u ispitivanjima usmjerenim na performanse specifične za tvrdnju (kao što su granica otkrivanja, preciznost unutar laboratorija, ponovljivost, točnost i klinička učinkovitost).

Tablica 43 navedene su definicije mjernih podataka izračunatih u raznim ispitivanjima.

Tablica 43 Definicije mjernih podataka

Pojam	Definicija
Postotak pozitivnog slaganja (PPA)	Postotak pozitivnih rezultata točno identificiranih iz ukupnih pozitivnih rezultata u odnosu na ortogonalnu metodu.
Postotak negativnog slaganja (NPA)	Postotak negativnih rezultata točno identificiranih iz ukupnih negativnih rezultata u odnosu na ortogonalnu metodu.
Ukupni postotak slaganja (OPA)	Postotak pozitivnih i negativnih točno identificiranih rezultata iz ukupnih opažanja u odnosu na ortogonalnu metodu.
Postotak pozitivne podudarnosti (PPC)	Postotak pozitivnih otkrivanja točno identificiranih iz ukupnih pozitivnih rezultata u odnosu na kontrolno stanje u izravnoj usporedbi u parovima.
Postotak negativne podudarnost (NPC)	Postotak negativnih otkrivanja točno identificiranih iz ukupnih negativnih rezultata u odnosu na kontrolno stanje u izravnoj usporedbi u parovima.
Postotak pozitivnih otkrivanja (PPC)	Postotak opažanja koja su pozitivna za cilj među opažanjima za koje se očekuje da će biti pozitivna za cilj.
Postotak negativnih otkrivanja (NPC)	Postotak opažanja koja su negativna za cilj među opažanjima za koje se očekuje da će biti negativna za cilj.

## Križna kontaminacija

Ispitivanje križne kontaminacije uzoraka provedeno je da bi se procijenilo jesu li lažno pozitivni rezultati nastali zbog kontaminacije među jažicama tijekom pripreme biblioteke uzoraka ili kontaminacije između dvije uzastopne obrade sekvenciranjem. Ova analiza provedena je za male varijante DNK-a (koje također utječu na TMB), fuzije, amplifikacije gena i MSI. Biblioteke su pripremljene iz karakteriziranih uzoraka u rasporedu šahovske ploče s naizmjeničnim uzorcima kako bi se procijenila kontaminacija među jažicama te s naizmjeničnim indeksima kako bi se procijenila kontaminacija između uzastopnih obrada sekvenciranjem na istom Instrument NextSeq 550Dx. Ispitivanje križne kontaminacije pokazalo je nulte događaje kontaminacije uočene pregledom otkrivenih varijanti u svakom uzorku, bez otkrivanja lažno pozitivnih rezultata.

Dva mjerenja kontrole kvalitete (CONTAMINATION\_SCORE i P\_VALUE) osmišljena su za TSO Comprehensive (EU) analizu radi otkrivanja kontaminacije uzorka u uzorcima DNK. Procijenjena je osjetljivost na otkrivanje kontaminacije. FFPE uzorci tumorskog DNK-a pomiješani su s različitim količinama normalnih FFPE uzoraka DNK-a kako bi se stvorili namjerno kontaminirani uzorci.

Ukupno je generirano 1112 opažanja kontaminacije, a kontaminacija je otkrivena u 95 % (1054) opažanja. Stopa otkrivanja povećana je na 96 % (939/976) kada je postotak kontaminacije bio između 10 % i 90 % (masa/masa). Od 37 opažanja između 10 % i 90 % kontaminacije pri kojoj nije otkrivena kontaminacija, 12 nije zadovoljilo specifikaciju pokrivenosti za otkrivanje malih varijanti DNK-a. Niska pokrivenost sprječava otkrivanje kontaminacije, ali male varijante DNK-a nisu prijavljene kako bi ublažile bilo kakav učinak kontaminacije. Petnaest opažanja nije ispunilo specifikaciju amplifikacije gena (medijan broja spremnika mjernih podataka kontrole kvalitete) kako bi se otkrila amplifikacija gena. Nijedan rezultat za amplifikaciju gena neće se izvijestiti za uzorke.

Ispitivanje je pokazalo da se očekuje da će TSO Comprehensive (EU) analiza imati nisku pojavu križne kontaminacije od jažice do jažice ili od obrade do obrade. Ti rezultati zajedno s mjernim podacima o kontaminaciji u softveru smanjuju rizik od rezultata lažnih varijanti zbog kontaminacije uzorka.

## Procjena kompleta za ekstrakciju nukleinske kiseline

Tri komercijalno dostupna kompleta za ekstrakciju DNK-a i RNK-a procijenjena su pomoću TSO Comprehensive (EU). Tri kompleta za ekstrakciju izolirala su i DNK i RNK iz istih dijelova isječka FFPE tkiva. Kompleti su se razlikovali u koracima za vezanje sredstva za deparafinizaciju i nukleinske kiseline ([Tablica 44](#)). Komplet 1 bio je dominantni komplet za ekstrakciju koji se koristi za utvrđivanje TSO Comprehensive (EU) učinkovitosti.

Tablica 44 Karakteristike kompleta

Komplet	Sredstvo za deparafinizaciju	Vezanje nukleinske kiseline
1	Vlasništvo	Stupac
2	Ksilen	Stupac
3	Mineralno ulje	Magnetna zrnca

Tablica 45 i Tablica 46 donose sažetak učinaka kompleta za ekstrakciju na valjanost biblioteke i otkrivanje varijanti. Razlika je prijavljena ako su sredstva kompleta za ekstrakciju bila značajno različita. Srednje vrijednosti razlika između kompleta za ekstrakciju izračunate su pomoću kompleta 1 kao kontrole jer je komplet 1 korišten za izdvajanje većine nukleinskih kiselina korištenih za TSO Comprehensive (EU) analitička ispitivanja. Prijavljena je srednja vrijednost razlike u odnosu na komplet 1 kako bi se ilustriralo kako različiti kompleti za ekstrakciju utječu na druga TSO Comprehensive (EU) analitička ispitivanja.

Tablica 45 Utjecaji kompleta za ekstrakciju na valjanost biblioteke

Vrsta varijante	Mjerni podaci kontrole kvalitete biblioteke	Srednja vrijednost razlike u odnosu na komplet 1
Male varijante DNK-a/TMB	Medijan pokrivenosti egzona (broj) PCT Exon50X (%) Medijan veličine umetka (bp)	Komplet 2 niže za 56 očitavanja Komplet 3 više za 0,298 % Komplet 2 i komplet 3 niže za 3 bp
DNK MSI	Upotrebljiva MSI mjesta	Komplet 3 više za 8 mjesta
Amplifikacija DNK gena	Pokrivenost MAD (broj) Medijan broja spremnika	Komplet 2 niže za 0,0043 Komplet 2 niže za 0,5825, komplet 3 više za 0,3086
RNK (fuzije/varijante spajanja)	Medijan veličine umetka (bp) Zapisnik (medijan CV Gene500X) Ukupno o ciljanim očitanjima	Komplet 3 više za 2 bp Komplet 2 više za 0,029 Nema značajne razlike

Uočeno je da komplet za ekstrakciju 2 i komplet 3 imaju povećana potporna očitavanja tako da fuzije i varijante spajanja u blizini LoD-a imaju veću vjerojatnost otkrivanja zbog odabira kompleta za ekstrakciju.

Tablica 46 Utjecaji kompleta za ekstrakciju na otkrivanje varijanti

Vrsta varijante (jedinice)	Otkrivanje varijanti (srednja vrijednost razlike u odnosu na komplet 1)
Male varijante DNK-a (VAF)	Nije tehnički značajno Ciljane varijante: odstupanja između kompleta bila su mala u odnosu na preostale Neciljane varijante: Nema značajnih razlika za prva dva VAF spremnika. Nema značajnih razlika kada se promatra statistička značajnost.
TMB (mutacija po megabazi)	Nije tehnički značajno, odstupanja između kompleta bila su mala u odnosu na preostale
MSI (% nestabilnih mjesta)	Komplet 3 niže za 1,9 % nestabilnih mjesta
Amplifikacija gena (promjena preklapanja)	Komplet 2 (0,06) i komplet 3 (0,08) viša promjena preklapanja
Fuzije (potporna očitavanja)	Komplet 2 imao je 51-postotno, a komplet 3 imao je 23-postotno povećanje u potpornim očitanjima

Vrsta varijante (jedinice)	Otkrivanje varijanti (srednja vrijednost razlike u odnosu na komplet 1)
Varijante spajanja (potporna očitavanja)	Komplet 2 i komplet 3 imali su povećanje od 48 % u potpornim očitanjima

## Ometajuće tvari

Procijenjen je utjecaj potencijalnih endogenih i egzogenih tvari na učinkovitost TSO Comprehensive (EU) analize. Endogene tvari (melanin i hemoglobin) dodane su u uzorke tijekom postupka ekstrakcije nukleinske kiseline. Egzogene tvari (etanol, ksilen i proteinaza K) bile su prisutne tijekom postupka ekstrakcije nukleinske kiseline, a također su dodane u pročišćenu nukleinsku kiselinu prije pripreme biblioteke. Tamo gdje je uočena interferencija s dodanom proteinazom K, procijenjene su i povećane koncentracije proteinaze K tijekom procesa ekstrakcije. Tvari su dodane FFPE uzorcima iz mozga, dojke, debelog crijeva, pluća, medularne štitnjače, NSCLC-a, jajnika, prostate, slinovnica, kože, mekog tkiva i tkiva štitnjače - osam je uzoraka ekstrahirano za DNK analizu, a 13 je ekstrahirano za RNK analizu. Postojala je endogena kontrola bez dodavanja i egzogena kontrola s dodanim puferom ili vodom za svaki od 16 jedinstvenih uzoraka. Učinak nekroze procijenjen je na drugom skupu od osam FFPE uzoraka iz tkiva mozga, debelog crijeva i pluća. Za svaki uzorak nekroze postojala je makrodisecirana kontrola bez nekroze. Za sve interferencije, četiri replike po uzorku po tvari testirane su TSO Comprehensive (EU) analizom i uspoređene s njihovim odgovarajućim kontrolnim stanjem za otkrivanje malih varijanti DNK-a, amplifikacija gena, fuzija RNK-a i varijanti spajanja RNK-a, kao i za MSI status i TMB rezultat. Uključene su i varijante CDx-a i profiliranja tumora.

### Otkrivanje DNK varijanti

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

### Otkrivanje varijanti RNK-a

Podaci ne podržavaju interferenciju melanina (0,2 mg/ml), etanola (5 %) i ksilena (0,0001 %) na fuzije RNK-a ili varijante spajanja. Hemoglobin (2 mg/ml) je interferirao (smanjen broj potpornih očitavanja) s tri različite varijante spajanja u MET genu. Nije bilo utjecaja na varijantu spajanja u AR genu (tri različita uzorka) i jednu u EGFR genu (jedan uzorak). Ako laboratorij koristi RNK s analizom, tkivo s hemoglobinom treba izbjegavati ili minimizirati prilikom uzimanja odsječaka iz bloka tkiva.

Proteinaza K (0,04 mg/ml u nukleinskoj kiselini) interferirala je s fuzijom RNK-a i varijantama spajanja. Proteinaza K testirana je pri 2,6 mg/ml i 5,2 mg/ml tijekom postupka ekstrakcije, što je 2x i 4x standardna koncentracija u komercijalno dostupnom kompletu. Fuzije su inhibirane pri 4x, ali ne i pri 2x proteinaze K. Varijante spajanja su inhibirane pri 2x proteinaze K. Proteinaza K ili ekvivalentni enzim ne smije se povećavati tijekom ekstrakcije iz standardne koncentracije navedene u kompletu za ekstrakciju.

## Nekroza

Prisutnost nekrotičnog tkiva do 70 % nije ometala TMB rezultat, MSI status, male varijante DNK-a ili otkrivanje varijanti spajanja RNK-a. Otkrivanje fuzija RNK-a (podržanim očitanjima) i amplifikacije gena (promjena preklapanja) smanjeno je u uzorcima s  $\geq 25\%$  (po području) nekrotičnog sadržaja u području tkiva. Ako isječki uzorka sadrže više od 25 % nekroze u ukupnom području tkiva, tada se nekrotično tkivo mora makrodisecirati.

## Stabilnost

### Stabilnost u stvarnom vremenu

Stabilnost u stvarnom vremenu korištena je za utvrđivanje vijeka trajanja kompleta za TSO Comprehensive (EU) analizu kada je pohranjen u skladu s uvjetima na oznaci. Dizajn ispitivanja temelji se na testiranju tri serije reagensa i koristio je klasični dizajn ispitivanja stabilnosti opisan u CLSI EP25-A. Kompleti su pohranjeni u konačnoj konfiguraciji kompleta tijekom trajanja ispitivanja, u uvjetima skladištenja definiranim na oznaci proizvoda. Zamrznute komponente kompleta pohranjene su na temperaturi od  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Komponente rashlađenog kompleta pohranjene su na temperaturi od  $2\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kompleti su testirani na kriterije izgleda i funkcionalnog otpuštanja kompleta u određenim vremenskim točkama. Također su analizirani trendovi određivanja varijanti i mjernih podataka QC uzorka za kontrolni materijal QC. Rok trajanja određen je za svaki reagens. Datumi isteka valjanosti dodjeljuju se na temelju datuma proizvodnje i roka trajanja. Istek valjanosti kompleta dodjeljuje se na temelju reagensa koji najranije istječe.

### Stabilnost uporabe kompleta

Stabilnost kompleta za TSO Comprehensive (EU) analizu procijenjena je u standardnim uvjetima uporabe tijekom vijeka trajanja kako bi se podržala višekratna uporaba kompleta. Komplet reagensa podvrgnut je višestrukom zamrzavanju/odmrzavanju i testiran kako bi se poduprlo do 4 uporabe kompleta. Osim toga, biblioteke 8 RNK i 8 DNK pripremljene su ukupno 3 puta za testiranje maksimalnog broja podržanih biblioteka (24 DNK i 24 RNK biblioteka po kompletu). Za sve testirane cikluse zamrzavanje–odmrzavanje i vremenske točke zadovoljeni su svi kriteriji za izdavanje funkcionalnih kompleta. Testiranje FFPE uzoraka s reagensima starosti  $\geq 25$  mjeseci provedeno je kako bi se procijenio utjecaj testiranja u primjeni na otkrivanje varijanti. Kvalitativna analiza ciljnih varijanti pokazuje da događaji u primjeni nisu utjecali na otkrivanje varijanti.

### Stabilnost nukleinske kiseline

Stabilnost nukleinskih kiselina (DNK i RNK) i njihova povezana kvantifikacija za uporabu s TruSight Oncology Comprehensive (EU) (TSO Comprehensive (EU)) analizom procijenjena je pomoću FFPE uzoraka iz više vrsta tkiva. FFPE blokovi su razdvojeni i sve su nukleinske kiseline ekstrahirane odjednom. Ekstrahirana nukleinska kiselina temeljito je izmiješana, kvantificirana, provjerena za kvalitetu nukleinske kiseline te alikvotirana u dva kompleta epruveta za jednokratnu uporabu koje treba zamrznuti u dvije vremenske točke: kontrola T0 (početna vrijednost) i test T1 ( $\geq 28$  dana). Sav ekstrahirani RNK pohranjen je na temperaturi od  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a sav ekstrahirani DNK pohranjen je na temperaturi od  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  za naznačena vremenska razdoblja, a zatim obrađen putem TSO Comprehensive (EU) analize u više replika i rukovatelja. Stanje testa T1 uspoređeno je s

kontrolom za status MSI, TMB rezultat, amplifikacije gena, male varijante DNK-a, fuzije RNK-a i varijante spajanja RNK-a. Podaci pokazuju da su nukleinske kiseline i njihova povezana kvantifikacija za uporabu s TSO Comprehensive (EU) analizom stabilne do 28 dana ako se čuvaju na preporučenim temperaturama (RNK na -85 °C do -65 °C i DNK na -25 °C do -15 °C).

## Stabilnost biblioteke

Stabilnost biblioteka pripremljenih TSO Comprehensive (EU) testom procijenjena je pomoću 8 FFPE uzoraka DNK-a i 8 FFPE uzoraka RNK-a iz 9 različitih vrsta tkiva testiranih u tri replike pomoću testa. Biblioteke iz PCR pločice u normaliziranoj biblioteci (NL) bile su objedinjene i sekvencirane 0. dana. Preostali volumen biblioteka na NL PCR pločici pohranjen je zamrznut (-25 °C do -15 °C), a zatim ponovno objedinjen i sekvenciran 30. dana. Bilo koji statistički značajni rezultati za male varijante DNK-a između 0. i 30. dana bili su tehnički zanemarivi. Nije bilo statističkih razlika između rezultata 0. dana i 30. dana za MSI status, TMB rezultat, amplifikacije gena, fuzije RNK-a i varijante spajanja RNK-a. Podaci pokazuju da su biblioteke generirane iz TSO Comprehensive (EU) analize stabilne do 30 dana na temperaturi od -25 °C do -15 °C.

## Stabilnost FFPE tkiva na preparatu

Stabilnost FFPE tkiva na preparatu za uporabu s TruSight Oncology Comprehensive (EU) (TSO Comprehensive (EU)) analizom procijenjena je presjecanjem FFPE blokova (sekcije od 5 µm) od raznih jedinstvenih uzoraka postavljenih na preparat, nakon čega je slijedilo čuvanje na sobnoj temperaturi (22 °C) tijekom 2 vremenske točke. RNK je ekstrahirana i pohranjena na temperaturi od -65 °C do -85 °C, a DNK je ekstrahirana i pohranjena na temperaturi od -15 °C do -25 °C manje od 1 tjedna prije testiranja. Materijal nukleinske kiseline kvantificiran je i obrađen putem TSO Comprehensive (EU) analize u roku od 24 sata za svaku vremensku točku. U svakoj vremenskoj točki testirano je više replika i rukovatelja po uzorku TSO Comprehensive (EU) analizom te je uspoređeno s vremenskom točkom T0 za MSI, TMB, amplifikacije gena, male varijante DNK-a, fuzije RNK-a i varijante spajanja RNK-a, uključujući varijante CDx-a i profiliranja tumora. Procijenjeno je otkrivanje varijanti i zadovoljava sve kriterije prihvatljivosti, što ukazuje da su FFPE tkiva na preparatu za upotrebu s TSO Comprehensive (EU) testom stabilna na sobnoj temperaturi do 4 tjedna (28 dana). Zabilježeno je da je 10 % smanjenje stope valjanosti kontrole kvalitete MSI biblioteke otkriveno nakon 4 tjedna (28 dana) zbog kombinacije rukovatelja i vremena pohrane, a RNK fuzije i spajanja imale su približno 25 % smanjenje podrške za očitavanja nakon pohrane na stakalcima tijekom 4 tjedna (28 dana).

## Zaštitno vezanje za ulaznu titraciju nukleinske kiseline

Unos nukleinske kiseline za TSO Comprehensive (EU) analizu procijenjen je testiranjem DNK-a iz 33 FFPE uzorka koji obuhvaćaju 17 vrsta tkiva, na razinama unosa u rasponu od 10 ng do 500 ng te testiranjem RNK-a iz 5 FFPE uzoraka od 5 vrsta tkiva na razinama unosa u rasponu od 10 ng do 85 ng. Procijenjeni su mjerni podaci QC biblioteke i bili su ovisni o uzorku. Rezultati DNK-a pokazali su da neki, ali ne i svi mjerni podaci QC uzorka DNK-a reagiraju na povećani unos iznad nominalnog unosa od 40 ng:

- MEDIAN\_INSERT\_SIZE nije odgovorio na unos iznad 30 ng.
- MEDIAN\_EXON\_COVERAGE pokazao je pozitivnu korelaciju s povećanjem unosa.



- PCT\_EXON\_50X povećan s povećanjem unosa do 80 ng.
- USABLE\_MSI\_SITES povećan s povećanjem unosa. Neki uzorci s manje od 40 USABLE\_MSI\_SITES pri 40 ng ispunili su specifikaciju pri višim unosima, što bi omogućilo izračunavanje MSI rezultata.
- MEDIAN\_BIN\_COUNT\_CNV\_TARGET povećan s povećanjem unosa.
- Povećanje unosa radi povećanja COVERAGE\_MAD prema gornjoj granici specifikacije.

Povećani su mjerni podaci QC uzorka RNK-a (MEDIAN\_INSERT\_SIZE i TOTAL\_ON\_TARGET\_READS) ili smanjeni (MEDIAN\_CV\_GENE\_500X) s 10 ng na 40 ng, ali se općenito nisu promijenili između unosa od 40 ng i 85 ng.

## Granica praznog uzorka

Postotak lažno pozitivnih rezultata (od ukupnih očekivanih negativnih rezultata) procijenjen je ponovljenim testiranjem FFPE-a normalnog ili benignog susjednog tkiva koje ne bi trebalo sadržavati somatske varijante za male varijante DNK-a, amplifikacije gena, MSI, fuzije RNK-a i varijante spajanja RNK-a. Lažno pozitivni rezultati nisu analizirani za TMB jer nema kliničke granične vrijednosti. Šest FFPE uzoraka DNK-a i 6 RNK-a analizirano je u duplikatu s 2 rukovatelja tijekom 3 dana za svaku od 2 serije reagensa. Podskup uzoraka ponovno je objedinjen i ponovno sekvenciran u formatu 3x samo DNK i 3x samo RNK za procjenu lažno pozitivnih rezultata s nekoliko multipleks konfiguracija podržanih ovim uređajem. Osim toga, 30 dodatnih uzoraka RNK-a obrađeno je u duplikatu koji su obrađeni s 1 serijom reagensa, podijeljenih između 2 rukovatelja. Ukupno je bilo 168 mogućih opažanja za DNK i 228 opažanja za RNK umanjeno nevažecim bibliotekama za svaku vrstu varijante. Postotak lažno pozitivnih rezultata izračunat je na razini gena za amplifikacije i na razini položaja (približno 1,9 milijuna položaja) za male varijante DNK-a. Postotak lažno pozitivnih rezultata za vrste varijanti DNK-a prikazan je u [Tablica 47](#). Postotak lažno pozitivnih rezultata za fuzije RNK-a i varijante spajanja bio je 0 % kako je prikazano u [Tablica 48](#).

Tablica 47 Lažno pozitivni rezultati prema vrsti varijante DNK-a

Vrsta varijante	Lažno pozitivni
Amplifikacija gena	0 % (0/9912)
Male varijante DNK-a	0,0001 % (271/295.801.567)
MSI	0 % (0/156)
TMB	N/P*

\* Lažno pozitivni rezultati nisu primjenjivi jer je TMB prijavljen kao rezultat i nema kvalitativni ishod.

Tablica 48 Lažno pozitivni rezultati prema vrsti varijante RNK-a

Vrsta varijante	Lažno pozitivni
Fuzija	0 % (0/226)
Varijanta spajanja	0 % (0/226)

## Granica otkrivanja

Provedena su dva ispitivanja kako bi se procijenile granice otkrivanja za TSO Comprehensive (EU). Ispitivanje 1 procijenilo je RET male varijante DNK-a, RET fuzije i NTRK1–3 fuzije. Ispitivanje 2 procijenilo je druge varijante profiliranja tumora.

### 1. ispitivanje

Utvrđene su granične vrijednosti otkrivanja (LoD) NTRK1, NTRK3 i RET malih varijanti DNK-a te fuzije NTRK1– 3 i RET-a. LoD je najniža vrijednost analita (na primjer, učestalost alela varijante ili potpornih očitavanja) koja se mogu dosljedno otkriti (granična vrijednost otkrivanja 95 % ili pogreška tipa II od 5 %). FFPE tkiva s RET malim varijantama DNK-a (medularni rak štitnjače), RET fuzije (papilarni rak štitnjače, atipični Spitz tumor) i NTRK1–3 fuzije (gliom niskog stupnja diferencijacije, glioblastoma multiforme, miofibroblastni sarkom, sarkom, sekretorni rak dojke, karcinom debelog crijeva), kao i FFPE-tretirana stanična linija s malim varijantama DNK-a NTRK1 i NTRK3 upotrijebljene su u ispitivanju. Svaki je uzorak razrijeđen na najmanje 5 razina testa (u rasponu od približno 0,01 – 0,10 VAF-a za male varijante DNK-a i 2 – 25 potpornih očitavanja za fuzije). Bilo je 18 opažanja za svaku razinu testa po seriji po varijanti koja su generirala 3 rukovatelja i 3 instrumenta za sekvenciranje koji su pokrenuli pripremu biblioteke tijekom 3 neuzastopna dana uz 2 replike svake razine testa uzorka. Testirane su dvije serije reagensa.

Za varijante DNK-a, 2 serije analizirane su neovisno pomoću probit regresije ili pristupa stope pogotka (najniža razina testa s stopom pogotka (procjena točke)  $\geq 95$  %) kako bi se odredio LoD za svaku varijantu po seriji. Veći LoD kroz dvije serije reagensa uzet je kao granica otkrivanja za varijantu ([Tablica 49](#)).

Za fuzije RNK-a korištene su FFPE stanične linije za procjenu vrijednosti LoD-a za svaki gen fuzije. LoD-ovi su zatim potvrđeni FFPE tkivima pomoću dvostrukih pripravaka biblioteke u 3 rukovatelja, 3 instrumenta i 3 serije reagensa kako bi se generirala 54 opažanja po varijanti u blizini LoD-a utvrđenog linijama FFPE stanica. Navedena ograničenja otkrivanja za svaku fuziju ([Tablica 50](#)) najniža su srednja vrijednost potpornih očitavanja koja su dosegla stopu pogotka (procjena točke)  $\geq 95$  %.

Tablica 49 Granica otkrivanja za NTRK1, NTRK3 i RET male varijante DNK-a

Marker	Kr	Položaj	Referenca	Alternativa	Granica prepoznavanja (Učestalost frekvencije 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

Marker	Kr	Položaj	Referenca	Alternativa	Granica prepoznavanja (Učestalost frekvencije alela)
NTRK3 G696A (SNV)*	Chr15	88472468	C	G	0,027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0,053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0,045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0,045
RET D898_E901del (delecija)*	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0,055

Chr = kromosom

\* Te su varijante DNK-a analizirane probit regresijom; ostale varijante DNK-a analizirane su pristupom stope pogodaka.

Tablica 50 Granica otkrivanja za NTRK i RET fuzije

Gen	Fuzija	Granica prepoznavanja (Potporna 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

## 2. ispitivanje

Procijenjene su granice otkrivanja (LoD-ovi) varijanti profiliranja tumora koje je prijavio TSO Comprehensive (EU). LoD je najniža vrijednost analita (učestalost varijante alela, promjena preklapanja ili potporna očitavanja) koja se mogu dosljedno otkriti (stopa pogotka od 95 % ili pogreška tipa II od 5 %). FFPE uzorci iz 17 vrsta tkiva koji sadrže varijante razrijeđeni su na više razina testa. Dva rukovatelja generirala su šest opažanja po razini pomoću različite serije reagensa i instrumenta.

## Varijante DNK-a

LoD-ovi 10 klasa malih varijanti DNK-a (ukupno 25 varijanti) i 2 amplifikacije DNK gena (ERBB2 i MET) utvrđeni su i sažeti kao rasponi (Tablica 51). Uključene su i varijante RET-a iz ispitivanja 1 LoD-a. Dva od 3 umetanja veća od 5 bp imala su LoD-ove od 0,034 i 0,036 VAF-a, dok je treći imao LoD od 0,215 VAF-a. Potonje je bila insercija u područje niske složenosti gdje insercija dodaje dodatna ponavljanja, utječe na poravnanje i zahtijeva više očitavanja za dosljedno otkrivanje. Stoga neki genomski konteksti niske složenosti mogu utjecati na otkrivanje umetanja > 5 bp.

Tablica 51 Granica otkrivanja za male varijante DNK-a i amplifikacije gena

Vrsta (jedinica mjere za LoD)	Klasa varijante / Genomski kontekst	Broj varijanti	Raspon
Male varijante DNK-a (učestalost varijanti alela)	SNV-ovi	5	0,016 – 0,064
	MNV-ovi	3	0,022 – 0,048
	Insercija (1 – 2 bp) se ponavlja u blizini homopolimernih ponavljanja	2	0,086 – 0,104
	Insercija (1 – 2 bp) se ponavlja u blizini dinukleotida	2	0,038 – 0,051
	Insercija (3 – 5 bp)	2	0,030 – 0,056
	Insercija (> 5 bp i do 25 bp)	3	0,034 – 0,215
	Delecija (1 – 2 bp) se ponavlja u blizini homopolimera	2	0,094 – 0,100
	Delecija (1 – 2 bp) se ponavlja u blizini dinukleotida	2	0,033 – 0,070
	Delecija (3 – 5 bp)	2	0,028 – 0,064
Delecija (> 5 i do 25 bp)	2	0,047 – 0,055	
Amplifikacije gena (promjena preklapanja)	Prema genu (ERBB2, MET)	2	2,034 – 2,195

## Fuzije

LoD-ovi su utvrđeni za 18 fuzija, što je uključivalo 20 gena u TSO Comprehensive (EU) panelu, koji su se kretali od 10 do 54,7 potpornih očitavanja (Tablica 52). U drugom ispitivanju, testirana su dodatna 3 gena (NTRK1 – 3). Gen RET testiran je ovdje i u drugom ispitivanju LoD-a. Šesnaest fuzija s utvrđenim LoD-ovima imalo je podatke u skladu s uobičajenim LoD-om od 16 potpornih očitavanja pomoću dvostrane, 95 % gornje granice pouzdanosti (UCL). Dvije fuzije imale su LoD-ove od 24,7 i 44,2 potpornih očitavanja koja nisu bila u skladu s uobičajenim LoD-om.

Fuzija FGFR2-SRPK2 s vrijednošću LoD-a od 24,7 potpornih očitavanja imala je regije s ponovljenim preklapanjem u točki prekida kao što je to označio softver TSO Comprehensive (EU) analize. Ponovljena područja unutar točke prekida obično imaju niže razine dokaza jer očitavanja mogu mapirati drugdje u genomu ili mogu ostati nepravilna. Osim toga, ponovljene regije čine postupak sastavljanja (koriste se za identifikaciju fuzijskih sekvenci) izazovnijim i zahtijevaju dodatne dokaze za izradu ispravne sekvence. SEPT14-EGFR je još jedan primjer fuzije s homolognom sekvencom u točki prekida.

Fuzija BCL2-IGHJ5 s vrijednošću LoD-a od 44,2 potporna očitavanja imala je vrlo kratak gen (IGHJ5) s točkom prekida u blizini početka egzona koji zahtijeva kratka poravnanja s prazninama. Stoga je za dosljedno otkrivanje bilo potrebno više očitavanja.

Tablica 52 Granica otkrivanja za fuzije

Fuzija	Točka prekida gena A	Točka prekida gena B	LoD	Uobičajeni 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

Fuzija	Točka prekida gena A	Točka prekida gena B	LoD	Uobičajeni LoD
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	44,2	ne
PAX3-FOXO1	41134997	223084859	54,7	da

## Varijante spajanja

Varijante spajanja dva RNK-a, MET-a i EGFR-a imale su LoD-ove 18,7 odnosno 24,8 potpornih očitavanja.

## Sadržaj tumora

Rezultati ispitivanja daju preporuke o sadržaju tumora za kliničke uzorke. Općenito, što je veći sadržaj tumora, to je veći „signal” (VAF, promjena preklapanja ili potporna očitavanja) za varijante u tumoru. Preporuke minimalnog sadržaja tumora temelje se na sljedećim opažanjima. Vrijednosti LoD-a za male varijante DNK-a nisu veće od 0,104 VAF-a (uz iznimku insercije TP53). Da bi se otkrile pokretačke mutacije u tumoru (učestalost varijante alela od 0,50), preporučuje se sadržaj tumora od 20 % tako da te mutacije imaju 0,10 VAF i budu na LoD-u ili iznad njega. Pri sadržaju tumora od 20 %, geni amplificirani na 5,5 promjena preklapanja (11 kopija) dosljedno bi se otkrili na temelju granice otkrivanja promjene preklapanja od 1,8 puta. Pri sadržaju tumora od 20 %, fuzije s 80 potpornih očitavanja dosljedno će se otkrivati na temelju granice otkrivanja 16 potpornih očitavanja.

## Ponovljivost

Provedena su dva ispitivanja radi procjene ponovljivosti TSO Comprehensive (EU) analize. Ispitivanje 1 procijenilo je RET male varijante DNK-a uz NTRK i RET varijante fuzije. Ispitivanje 2 procijenilo je dodatne varijante profiliranja tumora.

### 1. ispitivanje

Ovo je ispitivanje provedeno kako bi se procijenila ponovljivost TSO Comprehensive (EU) analize u 3 centra testiranja (1 unutarnji, 2 vanjska) s 2 rukovatelja po lokaciji, 2 replike unutar obrade i 3 neuzastopna dana testiranja. Testiranje je provedeno s panelom ponovljivosti koji je sadržavao uzorke DNK-a koji su sadržavali specifične poznate RET male varijante DNK-a i uzorke RNK-a koji su sadržavali specifične poznate varijante NTRK1 – 3 i RET fuzije iz uzoraka tkiva fiksiranih u formalinu i uklopljenih u parafin (FFPE) i staničnih linija. Panel je sadržavao članove panela DNK-a i RNK-a s razinama niskih varijanti i razinama visokih varijanti s istim brojem članova panela niske i visoke razine za svaku klasu varijanti. Članovi panela visoke razine ciljani su približno 2 do 3 puta u odnosu na LoD, a članovi panela niske razine ciljani su na približno LoD. U svakom centru, svaki je rukovatelj testirao članove panela u duplikatu 3 puta, generirajući 6 opažanja po cilju po članu panela. U sva 3 centra, generirano je 36 opažanja po članu panela (3 centra/instrumenata × 2 rukovatelja × 2 replike unutar obrade × 3 dana početka).

Postotak pozitivnih otkrivanja (PPC-ova) i postotak negativnih otkrivanja (PNC-ova) za ciljane male varijante DNK-a i ciljane varijante fuzije RNK-a na visokoj razini određen je kao primarne krajnje točke. PPC-ovi i PNC-ovi za ciljane male varijante DNK-a i ciljane varijante fuzije RNK-a na niskoj razini izračunati su kao sekundarne krajnje točke. Dvostrani 95-postotni intervali pouzdanosti (IP-ovi) povezani sa svim krajnjim točkama izračunati

prema metodi Wilsonovog rezultata. Provedene su primarne analize za procjenu PPC-a i PNC-a (s povezanim 95-postotnim IP-ima) u članova ciljanog panela visoke razine kombiniranjem opažanja TSO Comprehensive (EU) analize za određeni cilj u skupini članova panela koji predstavljaju primjenjivu klasu varijanti (na primjer, male varijante DNK-a i fuzije RNK-a) u različitim centrima/instrumentima, rukovateljima i obradama. Za svaku ciljnu varijantu, opažanja TSO Comprehensive (EU) analize u drugih članova panela na visokoj razini ciljanog za istu vrstu varijante, ali koja ne sadrže istu varijantu kako je određeno većinskim pravilom kombinirana su s izračunatim PNC-om. Ukupni PPC i PNC za članove ciljanog panela niske razine određeni su na sličan način.

## RET male varijante DNK-a

Za članove panela male varijante DNK-a visoke razine, ukupni PPC bio je 100,0 % (207/207; 95-postotni IP: 98,2 % do 100,0 %) (Tablica 53). Ukupni PNC za članove panela male varijante DNK-a visoke razine iznosio je 100,0 % (1035/1035; 95-postotni IP: 99,6 % do 100,0 %) (Tablica 54). Za članove ciljanog panela male varijante DNK-a niske razine, ukupni PPC za članove ciljanog panela male varijante DNK-a niske razine iznosio je 99,1 % (210/212; 95-postotni IP: 96,6 % do 99,7 %), a ukupni PNC bio je 100,0 % (1026/1026; 95-postotni IP: 99,6 % do 100,0 %).

Tablica 53 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje RET malih varijanti DNK-a u članova ciljanog panela visoke i niske razine

Razina varijante	Vrsta varijante	Ciljana varijanta (Nukleotid)	Ciljana varijanta (Aminokiselina)	n	Srednji VAF	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95-postotni IP*
Visoka	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0,156	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Visoka	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0,140	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Visoka	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0,116	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Visoka	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0,195	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Visoka	Brisanja	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0,199	100,0 % (33/33)	(89,6 %, 100,0 %)
Visoka	Umetanje	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0,095	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Visoka	Sve male varijante DNK-a visoke	Sve male varijante DNK-a visoke	Sve male varijante DNK-a visoke	207	Nije primjenjivo	100,0 % (207/207)	(98,2 %, 100,0 %)



Razina varijante	Vrsta varijante	Ciljana varijanta (Nukleotid)	Ciljana varijanta (Aminokiselina)	n	Srednji VAF	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95-postotni IP*
Niska	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0,042	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Niska	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0,033	94,3 % (33/35)	(81,4 %, 98,4 %)
Niska	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0,044	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Niska	MNV	chr10_43609949_GC_ AT	RET C634Y	36	0,071	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Niska	Brisanja	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_ E901del	34	0,065	100,0 % (34/34)	(89,8 %, 100,0 %)
Niska	Umetanje	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_ T636dup	36	0,037	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Niska	Sve male varijante DNK-a niske	Sve male varijante DNK-a niske	Sve male varijante DNK-a niske	212	Nije primjenjivo	99,1 % (210/212)	(96,6 %, 99,7 %)

Kratice: N/P, nije primjenjivo; VAF, učestalost alela varijante.

\* Dvostrani 95-postotni intervali pouzdanosti izračunati prema Wilsonovoj formuli.

Tablica 54 PNC TSO Comprehensive (EU) analiza za otkrivanje malih RET varijanti DNK-a u članova ciljanog panela visoke i niske razine

Razina varijante	Vrsta varijante	Ciljana varijanta (Nukleotid)	Ciljana varijanta (Aminokiselina)	n <sup>1</sup>	Postotak negativnih otkrivanja (%)	95 % IP <sup>2</sup>
Visoka	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100,0 % (173/173)	(97,8 %, 100,0 %)
Visoka	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Visoka	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Visoka	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100,0 % (172/172)	(97,8 %, 100,0 %)
Visoka	Brisanja	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100,0 % (174/174)	(97,8 %, 100,0 %)
Visoka	Umetanje	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100,0 % (171/171)	(97,8 %, 100,0 %)
Visoka	Sve male varijante DNK-a visoke	Sve male varijante DNK-a visoke	Sve male varijante DNK-a visoke	1035	100,0 % (1035/1035)	(99,6 %, 100,0 %)
Niska	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100,0 % (177/177)	(97,9 %, 100,0 %)
Niska	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100,0 % (143/143)	(97,4 %, 100,0 %)
Niska	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Niska	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)

Razina varijante	Vrsta varijante	Ciljana varijanta (Nukleotid)	Ciljana varijanta (Aminokiselina)	n <sup>1</sup>	Postotak negativnih otkrivanja (%)	95 % IP <sup>2</sup>
Niska	Brisanja	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_ E901del	178	100,0 % (178/178)	(97,9 %, 100,0 %)
Niska	Umetanje	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_ T636dup	176	100,0 % (176/176)	(97,9 %, 100,0 %)
Niska	Sve male varijante DNK-a niske	Sve male varijante DNK-a niske	Sve male varijante DNK-a niske	1026	100,0 % (1026/1026)	(99,6 %, 100,0 %)

<sup>1</sup> Sva opažanja objedinjena iz kombinacija varijanti članova panela za koje je većinsko otkrivanje negativno (ciljane varijante koje sadrže fuzije s manje od 50 % pozitivnih otkrivanja).

<sup>2</sup> Dvostrani 95-postotni interval pouzdanosti izračunat prema Wilsonovoj formuli.

Tablica 55 prikazuje analizu komponenti varijance učestalosti varijanti alela (VAF-ova) kroz približno 36 opažanja za svakog člana panela. Standardna devijacija (SD) i postotak koeficijenta varijacije (% CV; ukupni i za svaki izvor) izračunati su i predstavljeni za svaku ciljnu RET malu varijantu DNK-a.

Tablica 55 TSO Comprehensive (EU) Analiza komponenti varijance analize VAF-a u članova ciljnih panela malih varijanti DNK-a

Razina varijante	Vrsta varijante	Ciljana varijanta (Nukleotid)	Ciljana varijanta (Aminokiselina)	n	Srednji VAF	SD centra (% CV)	Rukovatelj SD (% CV)	SD dan (% CV)	SD replikata (% CV)	Ukupni SD (% CV)
Visoka	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 %)
Visoka	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 %)
Visoka	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 %)
Visoka	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 %)
Visoka	Brisanja	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 %)
Visoka	Umetanje	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 %)
Niska	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 %)
Niska	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 %)
Niska	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 %)
Niska	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 %)

Razina varijante	Vrsta varijante	Ciljana varijanta (Nukleotid)	Ciljana varijanta (Aminokiselina)	n	Srednji VAF	SD centra (% CV)	Rukovatelj SD (% CV)	SD dan (% CV)	SD replikata (% CV)	Ukupni SD (% CV)
Niska	Brisanja	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 %)
Niska	Umetanje	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 panela fuzije RNK-a visoke razine, ukupni PPC iznosio je 99,3 % (285/287; 95-postotni IP: 97,5 % do 99,8 %) (Tablica 56). PPC je bio 100 % za svakog člana panela visoke razine osim za člana panela BCAN-NTRK1 (PPC = 94,4 % [34/36; 95 % IP: 81,9 % do 98,5 %]). Ukupni PNC za članove panela fuzije RNK-a visoke razine iznosio je 100,0 % (1724/1724; 95-postotni IP: 99,8 % do 100,0 %) (Tablica 57). Za članove ciljanog panela fuzije RNK-a niske razine, ukupni PPC bio je 95,4 % (272/285; 95 % IP: 92,3 %, 97,3 %), a ukupni PNC 100,0 % (1851/1851; 95 % IP: 99,8 % do 100,0 %).

Tablica 56 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje NTRK i RET fuzija u članova ciljanog panela visoke i niske razine

Razina varijante	Ciljana fuzija	n	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95-postotni IP*
Visoka	LMNA-NTRK1	36	37,9	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Visoka	BCAN-NTRK1	36	33,6	94,4 % (34/36)	(81,9 %, 98,5 %)
Visoka	ETV6-NTRK2	36	24,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Visoka	TRIM24-NTRK2	36	36,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Visoka	ETV6-NTRK3	36	56,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Visoka	BTBD1-NTRK3	35	32,9	100,0 % (35/35)	(90,1 %, 100,0 %)
Visoka	NCOA4-RET	36	36,7	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Visoka	CCDC6-RET	36	33,4	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Visoka	Sve fuzije visoke	287	36,5	99,3 % (285/287)	(97,5 %, 99,8 %)
Niska	LMNA-NTRK1	36	13,8	94,4 % (34/36)	(81,9 %, 98,5 %)
Niska	BCAN-NTRK1	36	16,9	80,6 % (29/36)	(65,0 %, 90,2 %)
Niska	ETV6-NTRK2	35	15,2	94,3 % (33/35)	(81,4 %, 98,4 %)

Razina varijante	Ciljana fuzija	n	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95-postotni IP*
Niska	STRN-NTRK2	36	13,6	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Niska	ETV6-NTRK3	36	24,8	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Niska	BTBD1-NTRK3	36	18,1	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
Niska	NCOA4-RET	36	15,8	97,2 % (35/36)	(85,8 %, 99,5 %)
Niska	KIF5B-RET	34	16,6	97,1 % (33/34)	(85,1 %, 99,5 %)
Niska	Sve fuzije niske	285	16,8	95,4 % (272/285)	(92,3 %, 97,3 %)

\* Dvostrani 95-postotni interval pouzdanosti (IP) izračunat prema metodi Wilsonovog rezultata.

Tablica 57 PNC TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje NTRK i RET fuzija u članova neciljanih panela visoke i niske razine

Razina varijante	Ciljane fuzije	n <sup>1</sup>	Postotak negativnih otkrivanja (%)	95 % IP <sup>2</sup>
Visoka	LMNA-NTRK1	180	100,0 % (180/180)	(97,9 %, 100,0 %)
Visoka	BCAN-NTRK1	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Visoka	ETV6-NTRK2	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Visoka	TRIM24-NTRK2	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Visoka	ETV6-NTRK3	144	100,0 % (144/144)	(97,4 %, 100,0 %)
Visoka	BTBD1-NTRK3	216	100,0 % (216/216)	(98,2 %, 100,0 %)
Visoka	NCOA4-RET	215	100,0 % (215/215)	(98,2 %, 100,0 %)
Visoka	CCDC6-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Visoka	Sve fuzije - visoke	1724	100,0 % (1724/1724)	(99,8 %, 100,0 %)
Niska	LMNA-NTRK1	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)
Niska	BCAN-NTRK1	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Niska	ETV6-NTRK2	250	100,0 % (250/250)	(98,5 %, 100,0 %)
Niska	STRN-NTRK2	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)
Niska	ETV6-NTRK3	177	100,0 % (177/177)	(97,9 %, 100,0 %)
Niska	BTBD1-NTRK3	249	100,0 % (249/249)	(98,5 %, 100,0 %)

Razina varijante	Ciljane fuzije	n <sup>1</sup>	Postotak negativnih otkrivanja (%)	95 % IP <sup>2</sup>
Niska	NCOA4-RET	213	100,0 % (213/213)	(98,2 %, 100,0 %)
Niska	KIF5B-RET	251	100,0 % (251/251)	(98,5 %, 100,0 %)
Niska	Sve fuzije - niske	1851	100,0 % (1851/1851)	(99,8 %, 100,0 %)

<sup>1</sup> Sva opažanja objedinjena iz kombinacija varijanti članova panela za koje je većinsko otkrivanje negativno (ciljane varijante koje sadrže fuzije s manje od 50 % pozitivnih otkrivanja).

<sup>2</sup> Dvostrani 95-postotni interval pouzdanosti (IP) izračunat prema metodi Wilsonovog rezultata.

Tablica 58 prikazuje analizu komponenti varijance potpornih očitavanja u približno 36 opažanja unutar svake ciljane fuzije. SD i % CV-a (ukupni i za svaki izvor) izračunati su i predstavljeni za svaku ciljnu fuziju.

Tablica 58 TSO Comprehensive (EU) Analiza komponenti varijance analize za potporna očitavanja u članovima ciljanog panela za fuziju RNK-a

Razina varijante	Fuzija	n	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja	SD centra (% CV)	SD rukovatelj (% CV)	SD dan (% CV)	SD replikata (% CV)	Ukupni SD (% CV)
Visoka	LMNA-NTRK1	36	37,9	3,52 (9 %)	3,37 (9 %)	6,93 (18 %)	9,04 (24 %)	12,39 (33 %)
Visoka	BCAN-NTRK1	36	33,6	13,75 (41 %)	7,87 (23 %)	5,40 (16 %)	8,95 (27 %)	18,98 (57 %)
Visoka	ETV6-NTRK2	36	24,6	8,03 (33 %)	3,50 (14 %)	4,20 (17 %)	4,86 (20 %)	10,86 (44 %)
Visoka	TRIM24-NTRK2	36	36,6	11,44 (31 %)	4,24 (12 %)	6,82 (19 %)	6,87 (19 %)	15,57 (43 %)
Visoka	ETV6-NTRK3	36	56,4	11,49 (20 %)	10,20 (18 %)	9,25 (16 %)	8,69 (15 %)	19,93 (35 %)
Visoka	BTBD1-NTRK3	35	32,9	1,49 (5 %)	2,65 (8 %)	2,16 (7 %)	10,47 (32 %)	11,11 (34 %)
Visoka	NCOA4-RET	36	36,7	4,64 (13 %)	4,09 (11 %)	6,17 (17 %)	5,20 (14 %)	10,17 (28 %)
Visoka	CCDC6-RET	36	33,4	7,25 (22 %)	2,56 (8 %)	6,53 (20 %)	5,51 (16 %)	11,49 (34 %)
Niska	LMNA-NTRK1	36	13,8	1,79 (13 %)	0,00 (0 %)	2,74 (20 %)	4,37 (32 %)	5,47 (40 %)
Niska	BCAN-NTRK1	36	16,9	2,92 (17 %)	2,98 (18 %)	4,61 (27 %)	5,82 (34 %)	8,52 (50 %)



Razina varijante	Fuzija	n	Srednje vrijednosti potpunih očitavanja	SD centra (% CV)	SD rukovatelj (% CV)	SD dan (% CV)	SD replikata (% CV)	Ukupni SD (% CV)
Niska	ETV6-NTRK2	35	15,2	0,00 (0 %)	3,41 (22 %)	3,83 (25 %)	4,39 (29%)	6,75 (45%)
Niska	STRN-NTRK2	36	13,6	1,77 (13 %)	0,61 (5 %)	2,33 (17 %)	2,57 (19 %)	3,95 (29%)
Niska	ETV6-NTRK3	36	24,8	6,03 (24 %)	3,46 (14 %)	0,00 (0 %)	6,39 (26 %)	9,44 (38 %)
Niska	BTBD1-NTRK3	36	18,1	0,93 (5 %)	0,00 (0 %)	0,00 (0 %)	6,64 (37 %)	6,71 (37 %)
Niska	NCOA4-RET	36	15,8	2,08 (13 %)	1,03 (7 %)	0,00 (0 %)	5,11 (32 %)	5,61 (36 %)
Niska	KIF5B-RET	34	16,6	2,07 (12 %)	0,00 (0 %)	1,58 (10 %)	5,83 (35 %)	6,39 (39 %)

% CV: postotak koeficijenta varijacije.

SD: Standardna devijacija.

## 2. ispitivanje

Provedeno je drugo ispitivanje radi procjene ponovljivosti TSO Comprehensive (EU) analize u 3 centra testiranja (2 vanjska i 1 unutarnji), 2 rukovatelja/instrumenta po centru, 3 jedinstvene serije reagensa, 4 dana testiranja (neuzastopna) i 2 obrade sekvenciranjem po biblioteci uzoraka.

Testiranje je provedeno uporabom ekstrahiranih uzoraka DNK-a i RNK-a iz 41 FFPE uzorka tkiva i 1 FFPE stanične linije (s 1 FFPE uzorkom tkiva i linijom FFPE stanica korištenima za stvaranje po 2 člana panela). Uzorci tkiva sastojali su se od sljedećih vrsta: mokraćnog mjehura, kosti, mozga, dojke, debelog crijeva, jejunuma, bubrega, jetre, pluća, jajnika, prostate, kože, mekog tkiva, želuca, štitnjače i maternice. Testirano je ukupno 44 člana panela, uključujući članove DNK panela s malim varijantama DNK-a (SNV-ovi, MNV-ovi, insercije i delecije), amplifikacije gena, različite TMB rezultate, visoke MSI rezultate i članove RNK panela s fuzijama gena i varijantama spajanja. Većina članova panela imala je poznate ciljne varijante na razinama od približno 2 do 3 puta većim od granice otkrivanja specifične za varijantu (~2–3×LoD).

LoD je koncentracija analita u kojoj su uočeni rezultati analize pozitivni (varijanta otkrivena u odnosu na graničnu vrijednost TSO Comprehensive (EU) analize)  $\geq 95$  % vremena. Srednje uočene razine varijante kategorizirane su kao približno  $< 2 \times \text{LoD}$  (uočene razine varijanti na  $< 1,5 \times \text{LoD}$ ),  $\sim 2 - 3 \times \text{LoD}$  (uočene razine varijanti od  $1,5 \times \text{LoD}$  do  $3,4 \times \text{LoD}$ ) i približno  $> 3 \times \text{LoD}$  (uočene razine varijanti na  $> 3,4 \times \text{LoD}$ ).

Postotak pozitivnih otkrivanja (PPC-ovi) za male varijante DNK-a, amplifikacije gena, MSI-visoke (MSI-H) i varijante RNK-a izračunat je kombiniranjem opažanja u obradama sekvenciranjem i centrima. Postotak negativnih otkrivanja (PNC-ovi) slično je izračunat za male varijante DNK-a, amplifikacije gena i varijante RNK-a. Za svaku poznatu ciljnu varijantu, opažanja TSO Comprehensive (EU) analize u članovima panela iste vrste

varijante, ali koja sadrže druge varijante, koje nisu izvedene iz istog izvornog uzorka niti su poštovale pravilo većine za tu varijantu (< 50 % otkrivanja bilo je pozitivno) kombinirana su u različitim centrima, rukovateljima/instrumentima, danima, serijama reagensa i obradama sekvenciranja radi izračuna PNC-a. Dvostrani 95-postotni intervali pouzdanosti (IP-ovi) izračunati prema metodi Wilsonovog rezultata.

## Male varijante DNK-a

Tablica 59 prikazuje PPC-ove za ciljane male varijante DNK-a. PPC-ovi su se kretali od 91,3 % za BRAF SNV do 100 % za većinu malih varijanti DNK-a.

Tablica 59 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje malih varijanti DNK-a u članova kombiniranog ciljanog panela

Uočena razina varijante <sup>1</sup>	Vrsta varijante	Ciljana varijanta (nukleotid)	Ciljana varijanta (aminokiselina)	Srednja vrijednost VAF <sup>2</sup>	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95 % IP <sup>3</sup>
~2 – 3x LOD	DELECIJA	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0,181	100,0 % (28/28)	(87,9 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	DELECIJA	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0,166	100,0 % (40/40)	(91,2 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	INSERCIJA	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0,227	100,0 % (32/32)	(89,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	INSERCIJA	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0,100	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	INSERCIJA	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0,084	100,0 % (4/4)	(51,0 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0,045	91,3 % (42/46)	(79,7 %, 96,6 %)
~2 – 3x LOD	DELECIJA	chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	EGFR E746_ A750del	0,112	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0,045	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	DELECIJA	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0,245	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	INSERCIJA	chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_ A775dup	0,075	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0,155	100,0 % (36/36)	(90,4 %, 100,0 %)

Uočena razina varijante <sup>1</sup>	Vrsta varijante	Ciljana varijanta (nukleotid)	Ciljana varijanta (aminokiselina)	Srednja vrijednost VAF <sup>2</sup>	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95 % IP <sup>3</sup>
~2 – 3x LOD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0,111	100,0 % (38/38)	(90,8 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	INSERCIJA	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0,146	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	DELECIJA	chr10_89720798_ GTACT_G	PTEN T319fs*1	0,157	100,0 % (44/44)	(92,0 %, 100,0 %)
< 2x LOD	INSERCIJA	chr17_7578470_C_ CGGGCGG	TP53 P152_ P153dup	0,157	100,0 % (2/2)	(34,2 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	INSERCIJA	chr17_7574029_C_ CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0,154	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

<sup>1</sup> Razina varijante izračunata iz srednje vrijednosti uočene učestalosti varijante alela.

<sup>2</sup> Srednja vrijednost učestalost varijante alela izračunata iz uočenih rezultata analize.

<sup>3</sup> Dvostrani 95-postotni interval pouzdanosti izračunat prema Wilsonovoj formuli.

PNC-ovi su bili 100 % u malim varijantama DNK-a.

Tablica 60 prikazana je analiza komponenti varijance rezultata VAF-a za svaki izvor varijacije i ukupne varijacije u svim članovima panela s ciljanim malim varijantama DNK-a.

Tablica 60 Analiza komponenti varijance VAF-a za ciljane male varijante DNK-a

Ciljana varijanta	N	Srednji VAF	SD centra (% CV)	SD rukovatelja (centar) (% CV)	SD dana (centar, rukovatelj) SD (% CV)	SD serije (% CV)	SD obrade (% CV)	Ukupni SD (% CV)
chr2_209113112_C_T	36	0,155	0,008 (4,9)	0,006 (4,1)	0,034 (22,1)	0,000 (0,0)	0,016 (10,2)	0,039 (25,2)
chr4_153332910_C_ CAGG	44	0,130	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,013 (10,3)	0,014 (11,1)	0,008 (6,1)	0,021 (16,3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0,100	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,010 (10,4)	0,003 (2,9)	0,003 (3,3)	0,011 (11,3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0,166	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,024 (14,2)	0,000 (0,0)	0,011 (6,7)	0,026 (15,7)
chr5_112175751_CT_C	28	0,181	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,029 (15,8)	0,019 (10,8)	0,008 (4,7)	0,036 (19,7)
chr5_112175751_CTTTA_ C	46	0,155	0,000 (0,0)	0,009 (5,6)	0,023 (14,9)	0,015 (9,7)	0,008 (5,5)	0,030 (19,4)

Ciljana varijanta	N	Srednji VAF	SD centra (% CV)	SD rukovatelja (centar) (% CV)	SD dana (centar, rukovatelj) SD (% CV)	SD serije (% CV)	SD obrade (% CV)	Ukupni SD (% CV)
chr5_112175951_G_GA	32	0,227	0,000 (0,0)	0,006 (2,5)	0,034 (15,1)	0,000 (0,0)	0,011 (4,9)	0,036 (16,1)
chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	46	0,112	0,000 (0,0)	0,004 (3,8)	0,015 (13,7)	0,005 (4,1)	0,008 (6,9)	0,018 (16,3)
chr7_55259515_T_G	38	0,045	0,003 (6,0)	0,000 (0,0)	0,012 (27,3)	0,000 (0,0)	0,003 (6,8)	0,013 (28,8)
chr7_140453136_A_T	46	0,045	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,016 (34,9)	0,000 (0,0)	0,006 (12,2)	0,017 (36,9)
chr7_140453136_AC_TT	46	0,130	0,000 (0,0)	0,004 (2,9)	0,017 (13,4)	0,003 (2,6)	0,006 (4,9)	0,019 (14,8)
chr9_139399350_C_CG	48	0,146	0,015 (10,2)	0,000 (0,0)	0,012 (8,2)	0,000 (0,0)	0,004 (2,8)	0,020 (13,4)
chr10_89720798_ GTACT_G	44	0,157	0,000 (0,0)	0,003 (2,0)	0,021 (13,6)	0,002 (1,6)	0,010 (6,4)	0,024 (15,3)
chr12_25398284_CC_AT	38	0,111	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,019 (16,8)	0,003 (2,5)	0,008 (7,3)	0,020 (18,5)
chr17_7574002_CG_C	44	0,158	0,007 (4,2)	0,000 (0,0)	0,021 (13,5)	0,013 (8,6)	0,013 (8,2)	0,029 (18,4)
chr17_7574029_C_ CGGAT	48	0,154	0,000 (0,0)	0,000 (0,0)	0,017 (11,0)	0,006 (3,8)	0,010 (6,6)	0,021 (13,4)
chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	36	0,075	0,013 (16,9)	0,006 (8,1)	0,013 (16,7)	0,000 (0,0)	0,004 (4,7)	0,019 (25,5)
chr22_41574678_GC_G	44	0,245	0,006 (2,4)	0,002 (0,6)	0,019 (7,9)	0,000 (0,0)	0,005 (2,1)	0,021 (8,6)

Postojale su dvije ciljane male varijante DNK-a za koje je broj opažanja bio premalen da bi se uklopio u model komponenti varijance. Za te dvije ciljane varijante ukupni SD-ovi bili su 0,027 za varijantu chr1\_27024001\_C\_CG i 0,001 za varijantu chr17\_7578470\_C\_CGGGCGG.

## Amplifikacija gena

Tablica 61 prikazuje PPC-ove za ciljane amplifikacije gena. PPC-ovi su bili 100,0 % za MET i 100,0 % za ERBB2.

Tablica 61 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje amplifikacija gena u članova kombiniranog ciljanog panela

Uočena razina varijante <sup>1</sup>	Ciljana varijanta	Srednja vrijednost uočene promjene preklapanja <sup>2</sup>	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95 % CI <sup>3</sup>
~2 – 3x LOD	MET	5,14	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	ERBB2	2,33	100,0 % (47/47)	(92,4 %, 100,0 %)

<sup>1</sup> Razina varijante izračunata iz srednje vrijednosti uočene promjene preklapanja.

<sup>2</sup> Prosječna promjena preklapanja izračunata iz uočenih rezultata analize.

<sup>3</sup> Dvostrani 95-postotni interval pouzdanosti izračunat prema Wilsonovoj formuli.

PNC-ovi su bili 100 % u amplifikacijama gena.

Tablica 62 prikazana je analiza komponenti varijance rezultata promjene preklapanja za svaki izvor varijacije i ukupne varijacije u svih članova panela s ciljanim amplifikacijama gena.

Tablica 62 Analiza komponenti varijance promjene preklapanja za amplifikacije ciljanog gena

Ciljana varijanta	N	Srednja vrijednost promjena preklapanja	SD centra (% CV)	SD rukovatelja (centar) (% CV)	SD dana (centar, rukovatelj) SD (% CV)	SD serije (% CV)	SD obrade (% CV)	Ukupni 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

Tablica 63 prikazuje PPC-ove za članove ciljanog panela MSI-H. PPC-ovi su bili 100 % za oba člana MSI-H panela.

Tablica 63 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje statusa MSI-H u članova kombiniranog ciljanog panela

Član panela	Srednja vrijednost MSI rezultata <sup>1</sup>	N	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95 % IP <sup>2</sup>
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 %)

<sup>1</sup> Srednja vrijednost opaženog MSI rezultata izračunata iz uočenih rezultata analize.

<sup>2</sup> Dvostrani 95-postotni interval pouzdanosti izračunat prema metodi Wilsonovog rezultata.

Tablica 64 prikazana je analiza komponenti varijance MSI rezultata za svaki izvor varijacije i ukupne varijacije kod svih članova ciljanog panela za MSI-H status.

Tablica 64 Analiza komponenti varijance rezultata MSI za članove ciljanog MSI-H panela

Član panela	N	Srednja vrijednost MSI rezultata	SD centra (% CV)	SD rukovatelja (centar) (% CV)	SD dana (centar, rukovatelj) SD (% CV)	SD serije (% CV)	SD obrade (% CV)	Ukupni 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

Kako bi se procijenila ponovljivost TMB rezultata, provedena je kvantitativna analiza rezultata u članova ciljanog TMB panela, što je predstavljalo raspon očekivanih TMB rezultata. Tablica 65 prikazana je analiza komponenti varijance rezultata TMB rezultata za svaki izvor varijacije i ukupne varijacije u članovima TMB panela. Ukupni SD vrijednosti TMB rezultata bile su 1,0 (% CV = 13) za jednog člana panela (srednja vrijednost TMB = 7,6) i 1,1 (% CV = 2) za drugog člana panela (srednja vrijednost TMB = 63,2).

Tablica 65 Analiza komponenti varijance rezultata MSI za ciljane članove MSI panela

Član panela	N	Srednja vrijednost TMB rezultata	SD centra (% CV)	SD rukovatelja (centar) (% CV)	SD dana (centar, rukovatelj) SD (% CV)	SD serije (% CV)	SD obrade (% CV)	Ukupni 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)

Bio je 1 član TMB panela za kojeg je broj opažanja bio premali (N = 2) da bi se uklopio u model komponenti varijance. Za ovog člana panela, ukupni SD bio je 1,7.

## Varijante RNK-a

Tablica 66 prikazuje PPC-ove za ciljane varijante RNK-a. PPC-ovi su se kretali od 91,7 % za KIF5B-RET do 100 % za većinu varijanti RNK-a.

Tablica 66 PPC TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje varijanti RNK-a u članova kombiniranog ciljanog panela

Uočena razina varijante <sup>1</sup>	Vrsta varijante	Ciljana varijanta	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja <sup>2</sup>	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95 % CI <sup>3</sup>
~2 – 3x LOD	Fuzija	ACPP-ETV1	44,7	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)

Uočena razina varijante <sup>1</sup>	Vrsta varijante	Ciljana varijanta	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja <sup>2</sup>	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95 % CI <sup>3</sup>
~2 – 3x LOD	Fuzija	BCL2-IGHJ5	124,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	CD74-ROS1;GOPC	56,6	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	DHX8;ETV4-STAT3	48,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	EGFR-GALNT13	49,8	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	EML4-ALK	49,3	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	ESR1-CCDC170	45,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	FGFR1-GSR	61,1	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	FGFR2-SRPK2	53,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	FGFR3-TACC3	53,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	HNRNPUL1-AXL	58,0	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	Fuzija	KIF5B-RET	11,6	91,7 % (44/48)	(80,4 %, 96,7 %)
< 2x LOD	Fuzija	MKRN1-BRAF	33,4	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	Fuzija	PAX3-FOXO1	70,1	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
< 2x LOD	Fuzija	RAF1-VGLL4	15,9	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	SPIDR-NRG1	51,5	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Fuzija	TMPRSS2-ERG	43,5	97,9 % (47/48)	(89,1 %, 99,6 %)

Uočena razina varijante <sup>1</sup>	Vrsta varijante	Ciljana varijanta	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja <sup>2</sup>	Postotak pozitivnih otkrivanja (%)	95 % CI <sup>3</sup>
~2 – 3x LOD	Varijanta spajanja	EGFR vIII	64,0	100,0 % (46/46)	(92,3 %, 100,0 %)
~2 – 3x LOD	Varijanta spajanja	Preskakanje MET egzona 14	61,2	100,0 % (48/48)	(92,6 %, 100,0 %)

<sup>1</sup> Razina varijante izračunata iz srednjih vrijednosti uočenih potpornih očitavanja.

<sup>2</sup> Srednja vrijednost potpornih očitavanja izračunata iz uočenih rezultata analize.

<sup>3</sup> Dvostrani 95-postotni interval pouzdanosti izračunat prema Wilsonovoj formuli.

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

Tablica 67 prikazana je analiza komponenti varijance potpornih rezultata očitavanja za svaki izvor varijacije i ukupne varijacije u svim članovima panela s ciljanim varijantama RNK-a.

Tablica 67 Analiza komponenti varijance potpornih očitavanja za ciljane varijante RNK-a

Ciljana varijanta	N	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja	SD centra (% CV)	SD rukovatelja (centar) (% CV)	SD dana (centar, rukovatelj) SD (% CV)	SD serije (% CV)	SD obrade (% CV)	Ukupni 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)
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)



Ciljana varijanta	N	Srednje vrijednosti potpunih očitavanja	SD centra (% CV)	SD rukovatelja (centar) (% CV)	SD dana (centar, rukovatelj) SD (% CV)	SD serije (% CV)	SD obrade (% CV)	Ukupni SD (% CV)
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)
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 unutar laboratorija

Provedena su dva ispitivanja radi procjene preciznosti unutar laboratorija za TSO Comprehensive (EU). Ispitivanje 1 procijenilo je NTRK i RET fuzije i RET malih varijanti DNK-a. Ispitivanje 2 procijenilo je TMB i MSI.

### 1. ispitivanje

Preciznost unutar laboratorija procijenjena je za fuzije NTRK1 – 3 (niža razina glioma, glioblastom multiforme, miofibroblastični sarkom, sekretorni rak dojke), RET fuzije (rak štitnjače i tkiva kože od nepoznatog raka) i RET male varijante DNK-a (medularni rak štitnjače) s FFPE tkivima od indiciranih karcinoma. Svaki je uzorak testiran na dvije razine varijante: ~1x LoD (razina niske varijante) i ~2 – 3x LoD (razina visoke varijante) osim uzorka koji sadrži CCDC6-RET, koji je testiran samo na razini niske varijante. Svaki uzorak na svakoj razini testa analiziran je

u duplikatima u svakom događaju pripreme biblioteke s tri (3) rukovatelja. Svaki je rukovatelj započeo pripremu biblioteke tri (3) neuzastopna dana početka i sekvencirao na tri (3) instrumenta NextSeq 550Dx. Testirane su tri (3) serije reagensa koje su generirale 54 opažanja po razini. Neke razine imale su manje od 54 opažanja zbog nevažjećih biblioteka.

## Kvalitativna analiza

Kvalitativna podudarnost otkrivanja varijanti procijenjena je zasebno za dvije razine varijante za određenu varijantu iz skupnih opažanja u svim varijablama (rukovatelji, serije reagensa, instrumenti, dani i replike). Postotak pozitivnih otkrivanja (PPC) i postotak negativnih otkrivanja (PNC) i povezani dvostrani interval pouzdanosti od 95 % (Wilsonov rezultat) sažeti su u [Tablica 68](#) (male varijante DNK-a) i [Tablica 69](#) (fuzije RNK-a).

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

Na razini niske varijante (~1x LoD), PPC za male varijante DNK-a kretao se od 83,3 % do 98,1 %, a PPC za fuzije RNK-a kretao se od 90,7 % do 100 %. Za varijante s PPC-om < 95 %, srednji VAF-ovi (RET C634Y i RET D898\_E901del) ili potporna očitavanja (NCOA4-RET i BCAN-NTRK1) bili su ispod odgovarajućih granica otkrivanja. Na razini niske varijante, za sve varijante postignut je PNC od 100 %.

Tablica 68 Kvalitativni rezultati za ciljnu DNK varijantu

Razina varijante	Varijanta	Vrsta varijante	Srednji VAF	PPC (95 % IP)	PNC (95 % IP)
Niska (~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 %)

Razina varijante	Varijanta	Vrsta varijante	Srednji VAF	PPC (95 % IP)	PNC (95 % IP)
Visoka (~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 %)

\* Promjene nukleotida navedene su za svaku varijantu u odjeljku Granica otkrivanja osim za RET D631\_L633delinsE, koji je kromosom 10, položaj 43609940, referenca ACGAGCT, alternativa A.

Tablica 69 Kvalitativni rezultati za ciljane fuzije RNK-a

Razina varijante	Fuzija	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja	PPC (95 % IP)	PNC (95 % IP)
Niska	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 stanična 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 %)
Visoka	TPM3-NTRK1	57,1	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (481/481) (99,2 %, 100,0 %)
	BCAN-NTRK1	53,2	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (535/535) (99,3 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK2	52,0	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (535/535) (99,3 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK3	41,7	100,0 % (54/54) (93,4 %, 100,0 %)	100,0 % (481/481) (99,2 %, 100,0 %)
	ETV6-NTRK3 (FFPE stanična 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	Nije primjenjivo	Nije ispitivano	100,0 % (589/589) (99,4 %, 100,0 %)

## Kvalitativna analiza

Provedena je analiza komponenti varijance ograničene maksimalne vjerojatnosti (REML) kako bi se procijenila ukupna varijacija temeljne kontinuirane varijable (VAF za male varijante DNK-a i potporna očitavanja za fuzije RNK-a) i procijenile komponente preciznosti [standardna devijacija (SD), koeficijent varijacije (CV)] za svaki izvor varijacije [rukovatelji, instrumenti, dani, serije reagensa, rezidualni i ukupni]. Rezultati su prikazani u [Tablica 70](#) za male varijante DNK-a i [Tablica 71](#) za fuzije RNK-a.

Varijacija u VAF-u povećala se sa srednjom vrijednošću kao što se očekivalo za binomni omjer. Varijacija potpornih očitavanja povećala se sa srednjom vrijednošću kao što se očekivalo za podatke o broju. Rezidualna komponenta najviše je pridonijela ukupnoj varijanci i za male varijante DNK-a i fuzije RNK-a na obje razine što je poduprlo zaključak da je otkrivanje tih varijanti pomoću TSO Comprehensive (EU) robusno po pitanju rukovatelja, serija, instrumenata i dana.

Tablica 70 Kvantitativni SD i CV rezultati za ciljane male varijante DNK-a

Razina VAF-a	Varijanta	Vrsta varijante	N valjani pokušaji	Srednji VAF	Rukovatelj SD (% CV)	Instrument SD (% CV)	SD serije (% CV)	Dan SD (% CV)	Rezidualni SD (% CV)	Ukupno SD (% CV)
Niska (~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)

Razina VAF-a	Varijanta	Vrsta varijante	N valjani pokušaji	Srednji VAF	Rukovatelj SD (% CV)	Instrument SD (% CV)	SD serije (% CV)	Dan SD (% CV)	Rezidualni SD (% CV)	Ukupno SD (% CV)
Visoka (~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)

Tablica 71 Kvantitativni SD i CV rezultati za ciljane fuzije RNK-a

Razine potpornih očitavanja	Fuzija	N valjani pokušaji	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja	SD rukovatelj (% CV)	SD instrument (% CV)	SD serije (% CV)	SD dan (% CV)	Rezidualni SD (% CV)	Ukupni SD (% CV)
Niska	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 (stanična 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)



Razine potpornih očitavanja	Fuzija	N valjani pokušaji	Srednje vrijednosti potpornih očitavanja	SD rukovatelj (% CV)	SD instrument (% CV)	SD serije (% CV)	SD dan (% CV)	Rezidualni SD (% CV)	Ukupni SD (% CV)
Visoka	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 (stanična 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)

## 2. ispitivanje

Preciznost unutar laboratorija procijenjena je za TMB i MSI. Pet NSCLC FFPE uzoraka DNK-a na TMB i sedam FFPE uzoraka CRC-a za MSI, uključujući stabilne mikrosatelite (MSS) i MSI-visok (MSI-H), upotrijebljeno je za procjenu preciznosti na različitim razinama u rasponu rezultata. Svaki od uzoraka analiziran je dvaput s tri (3) rukovatelja, tri (3) dana, s tri (3) pripreme biblioteke za tri (3) serije reagensa pomoću tri instrumenta NextSeq 550Dx koji su generirali 54 opažanja po razini.

Kvalitativna podudarnost procijenjena je za MSI status. TSO Comprehensive (EU) analiza pokazala je 100-postotnu podudarnost za postotna pozitivna otkrivanja i postotna negativna otkrivanja za MSI status. Za TMB, TSO Comprehensive (EU) analiza izvješćuje o TMB rezultatu; kvalitativna podudarnost nije primjenjiva.

Ukupna varijacija rezultata TMB i MSI, zajedno s doprinosom izvora (instrumenti, rukovatelji, serije, dani i rezidualni), kvantificirana je pomoću modela komponenti varijance u rasponu rezultata. Standardna devijacija (SD) i koeficijent varijacije (CV) prikazani su u [Tablica 72](#) za TMB i [Tablica 73](#) za MSI po razini. Neke razine imale su manje od 54 opažanja zbog nevažjećih biblioteka.

Tablica 72 Kvantitativni TMB rezultat SD i CV rezultati

Razina	Srednja vrijednost TMB rezultata	N valjani pokušaji	Rukovatelj SD (% CV)	Instrument SD (% CV)	Seriya SD (% CV)	Dan SD (% CV)	Rezidualni 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 %)

Tablica 73 Kvantitativni MSI rezultat SD i CV rezultati

MSI status	Razina	Srednja vrijednost MSI rezultata (%)	N valjani pokušaji	Rukovatelj SD (% CV)	Instrument SD (% CV)	Serijski SD (% CV)	Dan SD (% CV)	Rezidualni SD (% CV)	Ukupno SD (% CV)
MS-stabilan	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 obično se povećava sa srednjom vrijednošću koja se očekuje od teoretskih distribucija podataka brojanja. Varijacija u MSI rezultatima za razine u blizini rezultata MSI = 50 veća je od varijacije MSI rezultata bliže 0 ili 100 u skladu s varijabilnošću iz teorijskih distribucija podataka o udjelima. Rezidualna komponenta i dalje je najveći doprinos ukupnoj varijanci za MSI i TMB rezultate podržavajući zaključak da su rezultati robusni po pitanju rukovatelja, serija, instrumenata i dana.

Vrijednosti C5 i C95 oko granične vrijednosti od 20,00 % utvrđene su za MSI pomoću profila preciznosti (Tablica 74).

Tablica 74 C5-C95 intervali za MSI

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

Međutim, budući da su MSI i TMB složeni biomarkeri, analitička izvedba može se razlikovati od uzorka do uzorka. To jest, TMB varijacija ne ovisi samo o TMB vrijednosti, već i o sastavu varijanti u uzorku, kao što su vrsta varijante (SNV, indel) i razina VAF-a (blizina graničnoj vrijednosti uključivanja). Isto tako, MSI varijacija ne ovisi samo o vrijednosti MSI vrijednosti, već i o sastavu lokacija u uzorku, kao što je broj nestabilnih lokacija i količina nestabilnosti po lokaciji.

Procijenjen je utjecaj sadržaja tumora na TMB i MSI rezultate. Za većinu uzoraka, sadržaj tumora  $\geq 30\%$  imao je zanemariv utjecaj na TMB rezultate iznad otprilike 10 mutacija po megabazi. TMB rezultati ostali su relativno nepromijenjeni s povećanjem sadržaja tumora. Za MSI-H uzorke, sadržaj tumora pokazao je pozitivnu, linearnu

korelaciju s MSI rezultatom. MSI-H uzorci u prosjeku su ostali MSI-H kada je sadržaj tumora bio  $\geq 30\%$ . Uzorci endometrija ponašali su se izrazito različito od drugih vrsta tkiva i utvrđeno je da je potrebna veća količina sadržaja tumora koji se zove MSI-H.

## Točnost profiliranja tumora

Otkrivanje varijanti TSO Comprehensive (EU) analizom uspoređeno je s rezultatima referentnih metoda. Male varijante DNK-a i TMB uspoređeni su eksterno validiranom NGS metodom cijelog egzoma. Amplifikacije gena uspoređene su s istom NGS metodom cijelog egzoma ili potvrđenom metodom Dual In-Situ hibridizacije (DISH) za amplifikacije HER2. MSI je procijenjen pomoću potvrđenog testa MSI-PCR. Varijante spajanja RNK-a uspoređene su s validiranom metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR). ROS1 i ALK fuzije uspoređene su s potvrđenim FISH analizama. Sve druge fuzije uspoređene su s kompozitnom metodom koja se sastojala od potvrđene NGS analize cijelog egzoma RNK-a (RNGS1), ciljanog NGS panela (RNGS2) i digitalnog PCR-a s kapljicama (ddPCR).

## Otkrivanje malih varijanti DNK-a

Otkrivanje malih varijanti DNK-a TSO Comprehensive (EU) analizom uspoređeno je s rezultatima sekvenciranja cijelog egzoma (WES) koji koristi WES s odgovarajućim parovima normalnih uzoraka tumora za otkrivanje zametnih i somatskih malih varijanti. Usporedba između malih varijanti, koje se sastoje od varijanti jednog nukleotida (SNV-ova), insercija i delecija, temeljila se na 124 uzorka od 14 različitih vrsta tkiva koji su bili valjani kako za TSO Comprehensive (EU) tako i za WES. TSO Comprehensive (EU), ali ne i WES analiza, može otkriti varijante više nukleotida (MNV-ovi, 2 – 3 bp) koje zahtijevaju faziranje. TSO Comprehensive (EU) MNV-ovi su procijenjeni kao pojedinačni SNV-ovi naspram WES-a. Sažetak podudarnosti na razini varijante, uključujući postotak pozitivnog slaganja (PPA) i postotak negativnog slaganja (NPA) za sve otkrivanja varijanti, prikazan je u [Tablica 75](#).

Tablica 75 Sažetak podudarnosti za otkrivanje malih varijanti procijenjen je prema statusu zametno ili somatsko

	WES somatski otkriveno	WES zametno otkriveno	WES nije otkriveno
TSO Comprehensive (EU) Otkriveno	382	33.163	426
TSO Comprehensive (EU) Nije otkriveno	69	61	70.000.481
<b>Ukupno</b>	<b>451</b>	<b>33.224</b>	<b>70.000.907</b>

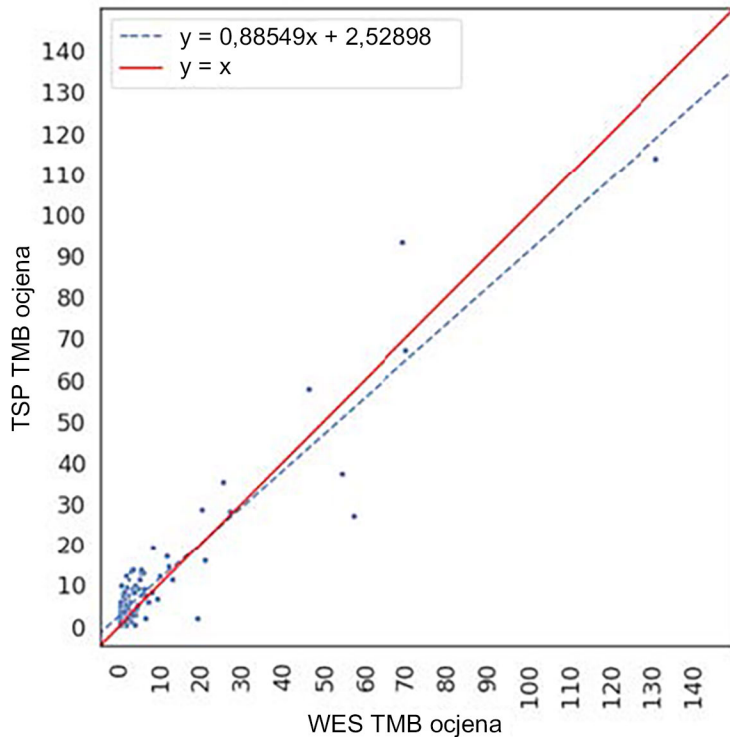
	WES somatski otkriveno	WES zametno otkriveno	WES nije otkriveno
Postotak slaganja	PPA: 85 % (382/451), 95-postotni IP: [81 % – 87 %]	PPA: > 99 % (33.163/33.224) 95-postotni IP: [99,8 % – 99,9 %]	NPA: > 99 % (70.000.481/70.000.907) 95-postotni IP: [99,999 % – 99,999 %]

Ukupno, TSO Comprehensive (EU) je otkrio 426 varijanti koje nisu otkrivene u WES metodi. Dvije stotine i četiri (48 %) ovih varijanti imale su učestalosti varijanti alela ispod praga za otkrivanje u WES metodi. Od preostalih potencijalnih lažno pozitivnih varijanti, bilo je dokaza o otkrivanju varijanti u WES metodi s niskom podrškom. Također, mnoge varijante imale su vrlo niske razine WES dokaza u podudarnim normalnim uzorcima. Ovaj rezultat sugerira da je WES propustio ove varijante u tumoru zbog tumora u normalnoj kontaminaciji.

### Otkrivanje opterećenja tumora mutacijama

Podudarnosti TMB-a određena je usporedbom TMB rezultata (somatske mutacije/megabaza) između WES metode i TSO Comprehensive (EU) za 124 uzorka s dostupnim podacima kako za TSO Comprehensive (EU) tako i za WES. Analiza linearne regresije s WES-om kao prediktorom imala je y-intercept od 2,53, pad od 0,89 i Pearsonov koeficijent korelacije od 0,94 (Slika 3).

Slika 3 Korelacija TMB rezultata između WES-a i TSO Comprehensive (EU)



## Otkrivanje amplifikacije gena

Otkrivanje amplifikacija gena TSO Comprehensive (EU) analizom uspoređeno je s rezultatima istog WES testa za koji su se upotrijebili podudarajući uzorci tumor-normalno ili uzorci samo za tumor. Ukupno je bilo 420 uzoraka od kojih je 183 koristilo metodu ortogonalnog metodu tumor-normalno, a 237 koristilo je metodu samo tumor. Uzorci su bili iz 14 vrsta tkiva i sadržavali su amplifikacije iz 55 gena. TSO Comprehensive (EU) izvješćuje o amplifikacijama gena iz gena MET i ERBB2. Međutim, točnost je procijenjena za svih 55 gena. Sažetak otkrivanja amplifikacije gena prikazan je u [Tablica 76](#).

Tablica 76 Otkrivanja amplifikacije gena

	WES pozitivni	WES negativni
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno	337	415
TSO Comprehensive (EU) Negativno	28	24.000
Ukupno	365	24.415
Postotak slaganja	PPA: 92 % (337/365) 95-postotni IP: [89 %, 95 %]	NPA: 98,3 % (24.000/24.415) 95-postotni IP: [98,1 %, 98,5 %]

Amplifikacije ERBB2 (HER2) u tkivima želuca i dojke analizirane su odvojeno od drugih amplifikacija gena primjenom metode Dual In-Situ hibridizacije (DISH). Ukupno je testirano 116 uzoraka dojke i želuca, od kojih su 64 prethodno karakterizirana kao HER2 pozitivna prema IHC-u ili FISH-u. Jedan je uzorak bio neuspješan u ekstrakciji, 4 su uzorka bila neuspješna u valjanosti za TSO Comprehensive (EU), a 3 su uzorka bila neuspješna u valjanosti za DISH analizu. Od 108 uzoraka, 20 (18,5 %) je imalo granične rezultate (između 1,5 i 2,5) blizu granične vrijednosti DISH-a od 2,0. Rezultati podudarnosti, uključujući PPA, NPA za sve uzorke i izuzev graničnih slučajeva HER2 DISH-a, prikazani su u [Tablica 77](#).

Tablica 77 Sažetak podudarnosti između TSO Comprehensive i HER2 DISH-a uključujući amplifikaciju gena HER2

Amplifikacija gena HER2 Sve (dojke i želudac)	HER2 DISH amplificiran	HER2 DISH nije amplificiran
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno	17 (uključujući 1 graničnu vrijednost)	13 (uključujući 1 graničnu vrijednost)
TSO Comprehensive (EU) Negativno	10 (uključujući 6 graničnih vrijednosti)	68 (uključujući 12 graničnih vrijednosti)
Postotak slaganja koji uključuje slučajeve granične vrijednosti	PPA: 63 % (17/27) 95-postotni IP: [44 %, 78 %]	NPA: 84 % (68/81) 95-postotni IP: [74 %, 90 %]
Postotak slaganja koji isključuje slučajeve granične vrijednosti	PPA: 80 % (16/20) 95-postotni IP: [58 %, 92 %]	NPA: 82 % (56/68) 95-postotni IP: [72 %, 90 %]

## Otkrivanje nestabilnosti mikrosatelita

Otkrivanje nestabilnosti mikrosatelita TSO Comprehensive (EU) analizom uspoređeno je s rezultatima potvrđenog MSI-PCR testa koji koristi normalne podudarne uzorke tumora za testiranje. Uspoređeno je ukupno 195 uzoraka koji su ispunili potrebu za sadržajem tumora od  $\geq 30\%$  i predstavljali 14 vrsta tkiva. MSI-PCR procjenjuje 5 lokacija i ima 3 ishoda – MSS (bez nestabilnih lokacija), MSI-nizak (jedna nestabilna lokacija) i MSI-visok (MSI-H) (dvije ili više nestabilnih lokacija). TSO Comprehensive (EU) procjenjuje do 130 mikrosatelitskih lokacija i klasificira samo uzorke kao MSS ili MSI-High ( $\geq 20\%$  nestabilnih lokacija). MSI-Low grupirani su s MSS ishodima za MSI-PCR. Analiza podudarnosti prikazana je u [Tablica 78](#).

Tablica 78 Sažetak analize podudarnosti između TSO Comprehensive (EU) i MSI-PCR-a za nestabilnost DNK mikrosatelita

MSI nestabilnost	PCR MSI-visok	PCR MSI – niska	PCR MSS
TSO Comprehensive (EU) Nestabilno (MSI-visoko)	40	2	0
TSO Comprehensive (EU) Stabilno (MSS)	3	0	150
Ukupno	43	2	150
Postotak slaganja	PPA: 93 % (40/43) 95-postotni IP: [81 %, 98 %]	NPA: 99 % (150/152) 95-postotni IP: [95 %, > 99 %]	

## Otkrivanje varijanti spajanja RNK-a

Točnost otkrivanja varijanti spajanja izračunata je usporedbom TSO Comprehensive (EU) rezultata s testovima qPCR za EGFRvIII i Met Exon 14del, uključujući jedan poznati pozitivni RNK za svaku od varijanti spajanja. Analiza podudarnosti provedena je na ukupno 230 jedinstvenih FFPE uzoraka RNK-a iz 14 vrsta tkiva s dostupnim podacima pomoću TSO Comprehensive (EU) i referentne metode. Svi su uzorci testirani na MET Exon 14del, dok je EGFRvIII testiran samo u tkivu mozga. Tri uzorka koja su otkrivena pozitivna na MET Exon 14del prema qPCR-u, ali ne prema TSO Comprehensive (EU) imala prosječni Ct > 37 i bila su ispod razine TSO Comprehensive (EU) LoD-a. [Tablica 79](#) donosi sažetak rezultata ispitivanja podudarnosti.

Tablica 79 Sažetak analize podudarnosti između TSO Comprehensive (EU) i qPCR analize za varijante spajanja RNK-a

Varijante spajanja RNK-a	qPCR pozitivna	qPCR negativna
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negativno (EGFRvIII)	0	13

Varijante spajanja RNK-a	qPCR pozitivna	qPCR negativna
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno (Met Exon 14Del)	1	0
TSO Comprehensive (EU) Negativno (Met Exon 14Del)	3	217
Ukupno	7	230
Postotak slaganja	PPA: 57 % (4/7) 95-postotni IP: [25 %, 84 %]	NPA: 100 % (230/230) 95-postotni IP: [98 %, 100 %]

## Otkrivanje fuzije RNK-a

### Usporedba s kompozitnom metodom

TSO Comprehensive (EU) fuzije uspoređene su s kompozitnom metodom koja se sastoji od sekvenciranja cijelog RNK egzoma pomoću NGS panela (RNGS1), ciljanog NGS panela fuzije (RNGS2) i digitalnog PCR-a s kapljicama (ddPCR).

Metoda RNGS1 preklapa se sa svim genima za koje TSO Comprehensive (EU) može otkriti fuzije. Međutim, granica otkrivanja metode RNGS1 bila je 4X – 8X od granice TSO Comprehensive (EU) na temelju broja potpunih očitavanja uočenih u preklapajućim otkrivanjima fuzije. Stoga je kompozitna metoda pomoću dvije dodatne metode s većom osjetljivošću, ali manje širine za fuzije, korištena s metodom WES (RNGS1).

Ukupno 255 jedinstvenih uzoraka RNK-a koji predstavljaju 14 vrsta tkiva i zadovoljavajući mjerni podaci TSO Comprehensive (EU) testirani su s RNGS1. Dva su uzorka bila nevažeca za QC uzorka RNGS1 i bila su isključena iz dodatne analize. Od 82 fuzije koje je otkrio TSO Comprehensive (EU), 4 su isključene iz evaluacije zbog neuspješne kontrole kvalitete uzorka RNGS1, a 7 dodatnih fuzija nije bilo moguće otkriti zbog odsutnosti ciljeva na panelu RNGS1. Od preostale 71 fuzije koje je otkrio TSO Comprehensive (EU), RNGS1 je potvrdio 9 fuzija. RNGS1 je otkrio 4 fuzije koje nije otkrio TSO Comprehensive (EU).

Od 62 fuzije koje su bile TSO Comprehensive (EU) pozitivne i koje RNGS1 nije otkrio, 13 ih se preklapalo s i potvrdio ih je RNGS2. Jednu fuziju otkrio je RNGS2, ali je nije otkrio TSO Comprehensive (EU).

Zatim je korišten digitalni PCR s kapljicama za fuzije koje je otkrio TSO Comprehensive (EU), koje nisu otkrivene ili ih nije bilo moguće otkriti pomoću RNGS1 i nije ih bilo moguće procijeniti pomoću RNGS2 (49). Osim toga, ddPCR je korišten za ponovnu procjenu 2 od 4 lažno negativne fuzije za TSO Comprehensive (EU) s RNGS1 i 2 od 9 usklađenih fuzija za TSO Comprehensive (EU) i RNGS1. Uz testiranje svakog pozitivnog uzorka fuzije uključeno je pet negativnih uzoraka fuzije kako bi se osigurala specifičnost. Osamnaest fuzija nije testirano ddPCR-om zbog nemogućnosti dizajniranja početnica/sondi, više partnera gena za fuziju ili nedovoljno preostalog FFPE materijala. Za ddPCR, početnice i sonde dizajnirane su prema uočenim točkama prekida u TSO Comprehensive (EU) analizi.

Ukupno 52 fuzije otkrivene su ddPCR-om, 41 od tih fuzija otkrivena je pomoću TSO Comprehensive (EU), ali nisu otkrivene ili ih nije bilo moguće otkriti pomoću RNGS1. Devet fuzija otkriveno je ddPCR-om, ali su bile negativne u TSO Comprehensive (EU) ili RNGS1. Dvije ddPCR pozitivne fuzije potvrdile su 2 usklađene fuzije za TSO



Comprehensive (EU) i RNGS1. Nije otkrivena nijedna fuzija ddPCR-om za 2 ponovno procijenjena TSO Comprehensive (EU) lažna negativna rezultata s RNGS1; međutim, ta se fuzije računaju kao lažno negativne na temelju RNGS1 usporedbe.

Rezultati metode kompozitne podudarnosti RNGS1, RNGS2 i ddPCR za fuzije prikazane su u [Tablica 80](#).

63 fuzije u skladu s kompozitnom metodom predstavljale su 43 gena u TSO Comprehensive (EU) panelu. Međutim, fuzije ispunjavaju uvjete za izvješćivanje samo iz 23 gena navedenih u [TSO Comprehensive \(EU\) Panel gena za analizu na stranici 2](#).

Tablica 80 Križna tablica TSO Comprehensive (EU) naspram ishoda kompozitne metode za fuzije RNK-a (253 uzoraka)

Fuzije	Kompozitna metoda pozitivno	Kompozitna metoda negativno
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno	63 <sup>1</sup>	18
TSO Comprehensive (EU) Negativno	14 <sup>2</sup>	13.821
Ukupno	77	13.839
Postotak slaganja	PPA: 82 % (63/77) 95-postotni IP: [72 %, 89 %]	NPA: 99,9 % (13821/13839) 95-postotni IP: [99,8 %, 99,9 %]

<sup>1</sup> 63 TSO Comprehensive (EU) istinski pozitivnih = 9 pozitivnih u skladu s RNGS1 + 13 pozitivnih u skladu s RNGS2 + 41 pozitivnih u skladu s ddPCR-om.

<sup>2</sup> 14 TSO Comprehensive (EU) lažno negativnih = 4 negativnih koji nisu u skladu s RNGS1 + 1 negativan koji nije u skladu s RNGS2 + 9 negativnih koji nisu u skladu s ddPCR-om.

## Usporedba s metodom FISH za ROS1 i ALK fuzije

FISH je testirao 25 uzoraka NSCLC-a na fuzije ROS1 i ALK, a 5 dodatnih NSCLC uzoraka testirano je na fuziju ROS1. FISH je bio neuspješan za 8 uzoraka za ROS1 zbog neodgovarajućeg tkiva. Dvije ROS1 i jedna ALK fuzija otkrivene su pomoću TSO Comprehensive (EU) i FISH-a. Nisu uočeni neusklađeni rezultati. [Tablica 81](#) su sažeti rezultati podudarnosti TSO Comprehensive (EU) i FISH metode za ROS1 i ALK fuzije.

Tablica 81 Sažetak rezultata podudarnosti TSO Comprehensive (EU) i FISH metode za ROS1 i ALK fuzije

ALK + ROS1	FISH pozitivni	FISH negativni
TSO Comprehensive (EU) Pozitivno	3	0
TSO Comprehensive (EU) Negativno	0	44
Ukupno	3	44
Postotak slaganja	PPA: 100 % (3/3) 95-postotni IP: [44 %, 100 %]	NPA: 100 % (44/44) 95-postotni IP: [92 %, 100 %]

## Valjanost uzorka

Valjanost uzorka (prvi pokušaj) izmjerena je za 181 jedinstveni RNK uzorak i 272 jedinstvena DNK uzorka iz FFPE blokova ≤ 5 godina starosti. Ti su uzorci odabrani na temelju vrste tkiva i dostupnog materijala; valjanost testa nije poznata. Mjerni podaci QC biblioteke moraju biti zadovoljavajući kako bi se vrsta varijante smatrala valjanom. Valjanost uzorka procijenjena je zasebno za svaku vrstu varijante (male varijante DNK-a/TMB, MSI, amplifikacije gena, fuzije/varijante spajanja) i prikazana u [Tablica 82](#).

Tablica 82 Valjanost uzorka

Vrsta varijante	Valjanost uzorka
Fuzije/varijante spajanja (RNK)	76 %
Male varijante DNK-a/TMB	75 %
MSI	72 %
Amplifikacija gena	94 %

## Sažetak analitičkog utvrđivanja valjanosti za zahtjeve za profiliranje tumora

Na temelju podataka o granici otkrivanja, preciznosti, ponovljivosti i točnosti, TSO Comprehensive (EU) je analitički potvrđen za sljedeće:

- Male varijante DNK-a – SNV-ovi, MNV-ovi, insercije i delecije
- TMB
- MSI
- Amplifikacije gena MET i ERBB2 (HER2) (pogledajte [TSO Comprehensive \(EU\) Panel gena za analizu na stranici 2](#)).
- 23 gena za koje se mogu otkriti fuzije (pogledajte [TSO Comprehensive \(EU\) Panel gena za analizu na stranici 2](#)).
- Varijante spajanja EGFR-a i MET-a (pogledajte [TSO Comprehensive \(EU\) Panel gena za analizu na stranici 2](#)).

## NTRK klinička učinkovitost

Kako bi se TSO Comprehensive (EU) analiza provjerila kao popratna dijagnostika (CDx) za odabir bolesnika za liječenje lijekom VITRAKVI (larotrectinib), uzorci bolesnika uključenih u klinička ispitivanja larotrectiniba (NCT02122913, NAVIGATE NCT02576431, SCOUT NCT02637687, zajednički nazvani uzorci ispitivanja larotrectiniba) korištenjem datuma prekida prikupljanja podataka od 15. srpnja 2019., dopunjeni komercijalno dobivenim uzorcima FFPE tkiva, testirani su kao podrška ispitivanju točnosti TSO Comprehensive (EU) analize i kliničkom ispitivanju vezivanja.

NCT02122913 je bilo multicentrično, otvoreno ispitivanje faze 1 povećanja doze u odraslih bolesnika s uznapredovalim čvrstim tumorima (svi bolesnici) koji nisu odabrani za karcinom pozitivan na NTRK fuziju. Nakon dijela ispitivanja povećanja doze, započeto je proširenje doze za bolesnike s dokumentiranim rakom pozitivnim na NTRK fuziju i za bolesnike za koje ispitivač vjeruje da bi mogli imati koristi od visoko selektivnog TRK

inhibitora. NAVIGATE NCT02576431 je tekuće, multicentrično, otvoreno „basket“ ispitivanje faze 2 u bolesnika u dobi od 12 godina i starijih s ponavljajućim uznapredovalim čvrstim tumorima s dokumentiranom NTRK fuzijom prema procjeni vanjskog laboratorija. SCOUT NCT02637687 je tekuće, multicentrično, otvoreno ispitivanje faze 1/2 u pedijatrijskih bolesnika u dobi od rođenja do 21 godine s uznapredovalim čvrstim tumorima ili tumorima primarnog središnjeg živčanog sustava (CNS).

Od bolesnika pozitivnih na NTRK fuziju uključenih u ispitivanje TSO Comprehensive (EU) analize, 164 su formirala skup za proširenu primarnu učinkovitost larotrectiniba (ePAS4).

## Ispitivanje točnosti za otkrivanje fuzija NTRK1, NTRK2, NTRK3

Točnost TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje NTRK fuzija (NTRK1, NTRK2 ili NTRK3) u bolesnika sa čvrstim tumorima dokazana je procjenom podudarnosti rezultata NTRK fuzije između TSO Comprehensive (EU) analize i potvrđene ortogonalne metode koja se temelji na NGS-u.

Provedeno je retrospektivno, neintervencijsko ispitivanje. Uzorci ispitivanja lijeka Larotrectinib i dodatni uzorci testirani su TSO Comprehensive (EU) analizom u jednom vanjskom centru i ortogonalnom metodom u središnjem laboratoriju. Točnost rezultata TSO Comprehensive (EU) analize NTRK fuzije procijenjena je u odnosu na ortogonalnu metodu; izračunat je postotak pozitivnog slaganja (PPA), postotak negativnog slaganja (NPA) i povezani dvostrani 95-postotni intervali pouzdanosti (IP).

Testirano je 516 uzoraka TSO Comprehensive (EU) analizom i/ili ortogonalnom metodom. Od tih uzoraka, 499 je testirano objema metodama. Sedamnaest od 516 uzoraka nije testirano s jednim od testova zbog neuspješne ekstrakcije, nepoznatog razloga (za ortogonalnu metodu) ili odstupanja od plana ispitivanja. Od 499 uzoraka testiranih objema metodama, 170 (34,1 %) bili su uzorci ispitivanja larotrectiniba, a 329 (65,9 %) bili su dodatni uzorci.

Križna tablica rezultata za 499 uzoraka prikazana je u [Tablica 83](#). Od 499 uzoraka, 85 uzoraka imalo je nevažee rezultate TSO Comprehensive (EU) analize; od tih 85, 53 je također imalo nevažee rezultate ortogonalne metode. Dodatnih 7 uzoraka imalo je nevažee rezultate ortogonalne metode. Dakle, 407 od 499 uzoraka imalo je valjane rezultate prema obje metode.

Tablica 83 Ispitivanje točnosti NTRK: Križna tablica TSO Comprehensive (EU) rezultata u odnosu na rezultat ortogonalne metode za otkrivanje NTRK fuzije

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

\* Nevažee rezultati TSO Comprehensive (EU) analize dolaze iz razine uzorka i obrade.

Analize slaganja, isključujući i uključujući nevažee rezultate TSO Comprehensive (EU) analize, prikazane su u [Tablica 84](#). Osim nevažeeh rezultata TSO Comprehensive (EU) analize, PPA je iznosio 96,6 % (114/118; 95-postotni IP: 91,5 % – 99,1 %), a NPA 94,5 % (273/289; 95-postotni IP: 91,2 % – 96,8 %).

Tablica 84 Ispitivanje točnosti NTRK: PPA i NPA TSO Comprehensive (EU) analize u usporedbi s rezultatom ortogonalne metode za otkrivanje NTRK fuzija

Mjere slaganja	Isključivanje nevažeeh rezultata TSO Comprehensive (EU) analize		Uključivanje nevažeeh rezultata TSO Comprehensive (EU) analize	
	Slaganje, % (n/N)	95-postotni IP*	Slaganje, % (n/N)	95-postotni IP*
PPA	96,6 % (114/118)	91,5 % – 99,1 %	93,4 % (114/122)	87,5 % – 97,1 %
NPA	94,5 % (273/289)	91,2 % – 96,8 %	86,1% (273/317)	81,8 % – 89,7 %

\* 95-postotni IP na temelju (egzaktne) Clopper-Pearsonove metode.

## Kliničko ispitivanje vezivanja za NTRK1, NTRK2, NTRK3 otkrivanje fuzije

Klinička valjanost TSO Comprehensive (EU) analize za otkrivanje fuzija NTRK1, NTRK2 ili NTRK3 u bolesnika sa solidnim tumorima koji bi mogli imati koristi od liječenja larotrectinibom dokazana je u kliničkom ispitivanju vezivanja. Ispitivanje je provedeno kako bi se procijenila klinička učinkovitost TSO Comprehensive (EU) analize u identifikaciji bolesnika pozitivnih na NTRK1, NTRK2 ili NTRK3 fuziju za liječenje larotrectinibom i kako bi se procijenila podudarnost između TSO Comprehensive (EU) analize i metoda lokalnog testiranja (LT) (koriste se za određivanje statusa fuzije NTRK za klinička ispitivanja larotrectiniba).

LT metode uključivale su analize NGS, fluorescentnu in situ hibridizaciju (FISH), lančanu reakciju polimerazom (PCR) i NanoString. NTRK fuzije (ETV6 NTRK3) izvedene su za bolesnike s infantilnim fibrosarkomom koji su imali dokumentiranu ETV6 translokaciju koju je identificirao FISH. Većina od 235 bolesnika u ispitivanju larotrectiniba s poznatim statusom fuzije NTRK ispitana je NGS metodama.

Ispitivanja NAVIGATE NCT02576431 i SCOUT NCT02637687 nastavljaju se uključivati. Do datuma prekida prikupljanja podataka 15. srpnja 2019. uključeno je 279 bolesnika. Od 279 bolesnika, 208 je bilo pozitivno na fuziju NTRK. Od 208 pozitivnih bolesnika, 164 su formirala larotrectinib ePAS4.

Primarna krajnja točka za analizu učinkovitosti larotrectiniba bila je ukupna stopa odgovora (ORR) prema procjeni neovisnog povjerenstva za reviziju (IRC) u skupnom skupu podataka iz tri klinička ispitivanja. ORR je procijenjen na temelju omjera bolesnika s najboljim ukupnim odgovorom potvrđenog potpunog odgovora ili potvrđenog djelomičnog odgovora na temelju kriterija RECIST, inačica 1.1. ORR u larotrectinib ePAS4 bio je 72,6 % (95 % IP [65,1 %, 79,2 %]) i uključivao je bolesnike sa 16 različitih vrsta tumora.

## Izračun uzoraka

Skup uzoraka uključivao je prikaz širokog raspona vrsta tumora te uzoraka pedijatrijskih i odraslih bolesnika.

Od 15. srpnja 2019. u ispitivanja larotrectiniba uključeno je 279 bolesnika. Od toga, 235 bolesnika imalo je poznati status NTRK fuzije kako je utvrđeno LT metodom: 208 je bilo pozitivno, a 27 negativno. Za 44 bolesnika status fuzije NTRK nije bio poznat jer testiranje nije bilo potrebno za podobnost bolesnika u fazama povećanja

doze ispitivanja NCT02122913 i SCOUT NCT02637687. Za kliničko ispitivanje vezivanja TSO Comprehensive (EU) analize, uzorci bolesnika u ispitivanju larotrectiniba uključeni do 15. srpnja 2019. s poznatim statusom NTRK fuzije (208 pozitivnih bolesnika i 27 negativnih bolesnika) i dodatni uzorci za koje je reprezentativnim metodama LT-a utvrđeno da su negativni na NTRK fuziju bili su podobni za ovo ispitivanje.

Od 208 pozitivnih uzoraka u ispitivanju larotrectiniba, 154 su imala dostupan uzorak za TSO Comprehensive (EU) analizu. Od toga ih je 138 imalo važeće rezultate. Petnaest uzoraka bilo je nevažeće zbog nezadovoljavajućih mjernih podataka kvalitete sekvenciranja uzoraka, a 1 uzorak nije testiran zbog odstupanja od plana ispitivanja. Od 27 pozitivnih uzoraka u ispitivanju larotrectiniba, 24 su imala dostupan uzorak za analizu. Od toga ih je 22 imalo važeće rezultate TSO Comprehensive (EU) analize. Dva uzorka nisu bila važeća zbog nezadovoljavajućih mjernih podataka kvalitete sekvenciranja uzoraka.

Dodatni uzorci bili su probрани pomoću jedne od dvije reprezentativne LT metode. Nabavljeno je i pregledano više od 350 uzoraka za sadržaj tumora. Od dodatnih uzoraka koji ispunjavaju zahtjeve za uzorke, 266 je uspješno ekstrahirano i reprezentativnom LT metodom potvrđeno da je NTRK fuzija negativna. Od tih uzoraka, 260 je bilo dostupno za TSO Comprehensive (EU) analizu od kojih je 222 imalo važeće rezultate. Bilo je 38 uzoraka koji su bili nevažeći zbog nezadovoljavajućih mjernih podataka sekvenciranja uzorka (n = 25) ili neuspješnog sekvenciranja obrade (n = 13). Ukupni negativni komplet za NTRK fuziju sastojao se od 222 dodatna uzorka i 22 uzorka za ispitivanje larotrectiniba.

## Rezultati podudarnosti

Ukupno je 437 uzoraka testirano pomoću TSO Comprehensive (EU). Među 208 bolesnika pozitivnih na fuziju NTRK bilo je 153 koji su imali dostupne uzorke i testirani su pomoću TSO Comprehensive (EU), dajući 138 valjanih rezultata i 15 nevaljanih rezultata.

Slaganje TSO Comprehensive (EU) rezultata u odnosu na rezultate LT metoda, s nevažećim TSO Comprehensive (EU) rezultatima i bez njih, prikazana je u [Tablica 85](#).

Tablica 85 Kliničko ispitivanje vezivanja NTRK: Podudarnost između TSO Comprehensive (EU) analize i LT metoda za otkrivanje NTRK fuzije

Mjere slaganja	Isključivanje nevažećih rezultata TSO Comprehensive (EU) analize		Uključivanje nevažećih rezultata TSO Comprehensive (EU) analize	
	% slaganja (n/N)	95-postotni IP*	% slaganja (n/N)	95-postotni IP*
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 IP-ovi od 95 % izračunati su pomoću (egzaktne) Clopper-Pearsonove metode.

Analiza osjetljivosti u odnosu na nedostajuće rezultate TSO Comprehensive (EU) analize pokazala je robusnost analize slaganja. Nedostaju rezultati TSO Comprehensive (EU) analize za bolesnike pozitivne na LT NTRK fuziju (n = 70) pripisani su pomoću modela logističke regresije. Procjene slaganja, uključujući unesene vrijednosti, prikazane su u [Tablica 86](#).

Tablica 86 Kliničko ispitivanje vezivanja NTRK: Podudarnost između TSO Comprehensive (EU) analize i LT metoda otkrivanja NTRK fuzija uključujući unesene vrijednosti za LT pozitivne bolesnike s nedostajućim rezultatima TSO Comprehensive (EU) analize

Mjere slaganja	% slaganja	95-postotni IP*
PPA	85,2 %	78,6 % – 91,7 %
NPA	96,3 %	93,9 % – 98,7 %
OPA	91,2 %	87,9 % – 94,5 %

Nisu uneseni nedostajući rezultati TSO Comprehensive (EU) analize za bolesnike negativne na LT fuziju.

\* Dvostrani 95 % IP-ovi izračunati su na temelju Boot metode višestruke imputacije. Boot metoda višestruke imputacije je korak pokretanja koji se nalazi u višestrukoj imputaciji (Schomaker i Heumann 2018).

Slaganja između TSO Comprehensive (EU) analize i LT-a prema vrsti metode (na primjer, RNK NGS, FISH) prikazana su u [Tablica 87](#).

Tablica 87 Kliničko ispitivanje vezivanja NTRK: Podudarnost između TSO Comprehensive (EU) analize i LT metoda za otkrivanje NTRK fuzija vrstom LT metode

Vrsta LT metode	Mjerenje slaganja	% slaganja (n/N)	95 % IP <sup>1</sup>
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 %
RNK NGS <sup>2</sup>	PPA	91,5 % (75/82)	83,2 % – 96,5 %
	NPA	96,9 % (218/225)	93,7 % – 98,7 %
	OPA	95,4 % (293/307)	92,5 % – 97,5 %
FISH	PPA	80,0 % (8/10)	44,4 % – 97,5 %
	NPA	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 podskupine s brojem uzoraka < 5 nije izračunata statistika slaganja.

<sup>1</sup> Dvostrani IP od 95 % izračunati su pomoću (egzaktne) Clopper-Pearsonove metode.

<sup>2</sup> Uključuje NGS metode koje koriste samo RNK te DNK i RNK.

Od 437 uzoraka testiranih TSO Comprehensive (EU) analizom, 24 su imala neusklađene rezultate s LT-ovima: 15 je bilo pozitivno prema LT-u, a negativno prema TSO Comprehensive (EU) analizi, a 9 je bilo negativno prema LT-u, a pozitivno prema TSO Comprehensive (EU) analizi. Od 24 uzorka s neusklađenim rezultatima, 8 je testirano metodom DNK NGS LT, 14 metodom RNK NGS LT i 2 metodom FISH.

Potvrđena neovisna NGS metoda potvrdila je rezultate TSO Comprehensive (EU) analize u 14 od 24 uzorka s neusklađenim rezultatima. Za preostalih 10 uzoraka rezultati TSO Comprehensive (EU) analize bili su neusklađeni kako s metodom LT tako i s neovisnom NGS metodom.

## Rezultati kliničke učinkovitosti

Unutar kohorte ePAS4, djelotvornost larotrectiniba u TSO Comprehensive (EU) pozitivnoj, LT pozitivnoj populaciji (97 bolesnika, ORR = 78,4 %, 95 % IP [68,8 %, 86,1 %]) bila je slična djelotvornosti larotrectiniba u ukupnoj populaciji ePAS4 (164 bolesnika, ORR = 72,6 %, 95 % IP [65,1 %, 79,2 %]) (Tablica 88). Od 97 TSO Comprehensive (EU) pozitivnih bolesnika u ispitivanju ePAS4, 28 (28,9 %) bolesnika postiglo je potpuni/kirurški potpuni odgovor, a 48 (49,5 %) bolesnika postiglo je djelomičan odgovor.

Od 13 TSO Comprehensive (EU) negativnih, LT pozitivne populacije, 1 (7,7 %) je pokazao potpuni odgovor, a 2 (15,4 %) je pokazalo djelomičan odgovor na terapiju larotrectinibom.

Tablica 88 Kliničko ispitivanje vezivanja NTRK: ORR za LT pozitivne bolesnike prema LT-u i TSO Comprehensive (EU) rezultatima u ePAS4

		LT fuzija pozitivan N = 164	TSO Comprehensive (EU) Pozitivan i LT pozitivan N = 97	TSO Comprehensive (EU) Negativan i LT pozitivan N = 13
<b>Najbolji ukupni odgovor, n (%)</b>	Potpuni odgovor	31 (18,9 %)	22 (22,7 %)	1 (7,7 %)
	Kirurški potpuni odgovor	8 (4,9 %)	6 (6,2 %)	0
	Djelomični 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 moguće procijeniti	7 (4,3 %)	2 (2,1 %)	1 (7,7 %)
<b>Ukupna stopa odgovora</b>	Broj bolesnika, n	164	97	13
	Broj bolesnika s CR + sCR + PR, n	119	76	3
	ORR % (95 % IP*)	72,6 % (65,1 %, 79,2 %)	78,4 % (68,8 %, 86,1 %)	23,1 % (5,0 %, 53,8 %)

Kratice: CR = potpuni odgovor, PR = djelomični odgovor, sCR = kirurški potpuni odgovor.

\* Dvostrani interval pouzdanosti od 95 % izračunat je pomoću (egzaktne) Clopper-Pearsonove metode.

54 bolesnika nemaju rezultate TSO Comprehensive (EU) analize.

Podaci iz ovog ispitivanja podržavaju sigurnost i učinkovitost TSO Comprehensive (EU) analize kada se koristi za identifikaciju bolesnika sa čvrstim tumorima s NTRK fuzijama koji mogu biti podobni za liječenje larotrectinibom.



## Reference

1. American Society of Clinical Oncology. [www.asco.org](http://www.asco.org). Pristupljeno 3. listopada 2016.
2. Europsko društvo za medicinsku onkologiju. [www.esmo.org](http://www.esmo.org). Pristupljeno 3. listopada 2016.

## Povijest revizija

Revizija	Datum	Opis promjene
v07	Siječanj 2024.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dodane informacije u Ograničenja postupka:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Zahtjevi za uzorke nekrotičnog tkiva i sadržaja tumora za status MSI-visok i pokretačke somatske mutacije.</li> <li>Potencijalne smetnje uzrokovane hemoglobinom.</li> <li>Granice otkrivanja u RET genu i otkrivanju fuzije izvan su zabilježenih granica gena.</li> <li>Analiza ne prijavljuje delecije gena.</li> </ul> </li> <li>Ažurirano za upotrebu sa softverom TSO Comprehensive (EU) Local Run Manager verzije 2.3.7.</li> <li>Dodane informacije o potrebnoj, ali neisporučenoj opremi i materijalima, uključujući dvije dodatne konfiguracije ultrazvučnog uređaja.</li> <li>Ažurirane informacije o uzorku i primjerku:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Sadržaj nekrotičnog tkiva.</li> <li>Učinci proteinaze K i hemoglobina.</li> <li>Čuvanje FFPE i pročišćene nukleinske kiseline na preparatu.</li> </ul> </li> <li>Dodane su informacije za poboljšanje rukovanja reagensima, tijekom rada i rješavanja problema s neuspjelim pokretanjem kontrole kvalitete.</li> <li>Dodan kontekst i jasnoća karakteristikama učinkovitosti:               <ul style="list-style-type: none"> <li>Križna kontaminacija</li> <li>Procjena kompleta za ekstrakciju nukleinske kiseline</li> <li>Ometajuće tvari</li> <li>Nukleinska kiselina i FFPE stabilnost preparata</li> <li>NTRK klinička učinkovitost</li> </ul> </li> <li>Ažuriran jezik i gramatika</li> </ul>
v06	Veljača 2023.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dodatne izjave u odjeljku Ograničenja</li> <li>Ažuriranja jezika u vezi s konvencijom, gramatikom i jasnoćom</li> <li>Ispravak tablica 21, 28, 29, 32, 35, 36, 72</li> <li>Izjava o prisutnosti taloga u reagensu FSM</li> <li>Ažurirane specifikacije termociklera i korita u Popisu opreme i materijala</li> </ul>
v05	Rujan 2022.	Ažurirane tablice ponovljivosti ispitivanja 2
v04	Lipanj 2022.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dodan modul za analizu TSO Comprehensive v2.3.5 PNs</li> <li>Uklonjen modul za analizu TSO Comprehensive v2.3.3 PNs</li> <li>Ažurirana terminologija u odjeljku Granica praznog uzorka</li> </ul>

Revizija	Datum	Opis promjene
v03	Travanj 2022.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dodane informacije o karakteristikama učinkovitosti koje se odnose na NTRK fuzije</li><li>• Dodana oznaka SAMO ZA IZVOZ</li><li>• Ažurirana izjava o namjeni kako bi se dodao zahtjev za NTRK1-3 CDx</li><li>• Proširene informacije o komponentama proizvoda kako bi se uključile softverske komponente PN-ova</li></ul>
v02	Veljača 2022.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ispravljena pogreška referentne tablice</li><li>• Dodano ograničenje koje se odnosi na zametne i somatske varijante</li><li>• Pojašnjen jezik oko otkrivanja amplifikacije gena</li></ul>
v01	Prosinac 2021.	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ažurirana ograničenja postupka</li><li>• Pojašnjen magnetni stalak i specifikacije termociklera na popisima opreme i materijala</li></ul>
v00	Studen 2021.	Početno izdanje

## Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj vlasništvo su tvrtke Illumina, Inc. i njezinih povezanih društava („Illumina“) te su namijenjeni isključivo za ugovornu upotrebu klijentima u vezi s proizvodom(ima) opisanim(a) u njemu(ima). Dokument i njegov sadržaj ne smiju se upotrebljavati ni distribuirati ni u koju drugu svrhu niti se smiju na neki drugi način prenositi, otkrivati ili reproducirati bez prethodnog pisanog odobrenja tvrtke Illumina. Illumina ovim dokumentom ne prenosi nikakve licencije zaštićene svojim pravom na patent, žig, autorskim pravom ili običajnim pravom ni slična prava bilo koje treće strane.

Kvalificirano osoblje s odgovarajućom izobrazbom mora se strogo i bez iznimki pridržavati uputa u ovom dokumentu da bi se zajamčila pravilna i sigurna upotreba proizvoda opisanih u njemu. Prije upotrebe proizvoda nužno je s razumijevanjem pročitati cjelokupan sadržaj dokumenta.

AKO UPUTE U DOKUMENTU NE PROČITATE U CIJELOSTI TE IH SE NE PRIDRŽAVATE BEZ IZNIMKI, MOŽE DOĆI DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, OZLJEDA KORISNIKA ILI DRUGIH OSOBA I DO OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE TE SE TIME PONIŠTAVAJU SVA JAMSTVA ZA PROIZVOD(E).

ILLUMINA NE PREUZIMA ODGOVORNOST ZA ŠTETE NASTALE USLIJED NEPRAVILNE UPOTREBE PROIZVODA KOJI JE(SU) OPISAN(I) U OVOM DOKUMENTU (UKLJUČUJUĆI DIJELOVE TOG(TIH) PROIZVODA I SOFTVER).

© 2024. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

Svi su žigovi vlasništvo tvrtke Illumina, Inc. ili svojih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Podaci za kontakt



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

CE

IVD



## Oznaka proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se nalaze na pakiranju proizvoda i naljepnica potražite u legendi simbola na web-mjestu [support.illumina.com](http://support.illumina.com) na kartici *Documentation* (Dokumentacija) za vaš komplet.